

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-505284

(43) 公表日 平成8年(1996)6月11日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A		
A 6 1 K 38/00	A B F		
39/36		9284-4C	
		9281-4B	C 1 2 N 15/00
		9455-4C	A 6 1 K 37/02
			Z N A A
			A B F
			審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全110頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-512408  
(86) (22) 出願日 平成5年(1993)11月12日  
(85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)5月12日  
(86) 国際出願番号 PCT/US93/11000  
(87) 国際公開番号 WO94/11512  
(87) 国際公開日 平成6年(1994)5月26日  
(31) 優先権主張番号 07/975, 179  
(32) 優先日 1992年11月12日  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP, KR, N Z

(71) 出願人 イミュロジック ファーマスーティカル  
コーポレーション  
アメリカ合衆国 02154 マサチューセツ  
ツ, ウォルサム, リンカン ストリート  
610  
(72) 発明者 クウォー, メイチャング  
アメリカ合衆国 01890 マサチューセツ  
ツ, ウィンチェスタ, コクス ロード 5  
(72) 発明者 ユング, シウメイ ヘレナ  
アメリカ合衆国 01801 マサチューセツ  
ツ, ウォーバーン, キンバル コート  
2, アパートメント 303  
(74) 代理人 弁理士 倉内 基弘 (外1名)  
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 杉花粉由来のアレルゲン性蛋白質及びペプチド

(57) 【要約】

本発明は、Cryptomeria japonica 主要花粉アレルゲン CryjII 及びその断片をコードする核酸配列を提供する。本発明は又、CryjII 又は少なくともその1断片をコードする核酸配列でトランスフォームした宿主細胞にて生成した精製CryjII 及びその少なくとも1断片並びに合成により調製したCryjの断片をも提供する。CryjII 及びその断片は、杉花粉症を診断し、治療し及び予防するのに有用である。

## 【特許請求の範囲】

1. 杉花粉アレルゲンCryjII又はその少なくとも1つの抗原性断片をコードするヌクレオチド配列を有する核酸、又は該ヌクレオチド配列の機能的等価物。
2. 該ヌクレオチド配列が、本質的に図4のヌクレオチド配列（配列番号：1）のコード部分の少なくとも1断片からなる、請求の範囲第1項に記載の核酸。
3. 該断片が、図4のヌクレオチド配列（配列番号：1）の塩基108～1586（配列番号：9）を含む、請求の範囲第1項に記載の核酸。
4. 該ヌクレオチド配列が、本質的に図4のヌクレオチド配列（配列番号：1）からなる、請求の範囲第1項に記載の核酸。
5. 該断片が、図4のヌクレオチド配列の塩基177～1586（配列番号：7）及び図4のヌクレオチド配列（配列番号：1）の塩基192～1586（配列番号：8）からなる群より選択する塩基を含む、請求の範囲第1項に記載の核酸。
6. 杉花粉アレルゲンCryjII又はその少なくとも1つの抗原性断片をコードするヌクレオチド配列、又は該ヌクレオチド配列の機能的等価物を含む発現ベクター。
7. 該ヌクレオチド配列が、本質的に図4のヌクレオチド配列（配列番号：1）のコード部分の少なくとも1断片からなる、請求の範囲第6項に記載の発現ベクター。
8. 該ヌクレオチド配列が、図4のヌクレオチド配列の塩基108～1586（配列番号：9）を含む、請求の範囲第6項に記載の発現ベクター。
9. 請求の範囲第1項に記載の核酸によりコードされる蛋白質又はペプチドを発現するようにトランスフォームされた宿主細胞。
10. 請求の範囲第1項に記載の核酸でトランスフォームした宿主細胞において産生された、単離されたCryjII蛋白質又はその少なくとも1つの抗原性断片。
11. 杉花粉アレルゲンに特異的な免疫グロブリンEと結合しないか又は該免疫グロブリンEとの結合が起きる場合でもかかる結合がマスト細胞若しくは好塩基球からのヒスタミンの放出を生じない、請求の範囲第10項に記載の抗原性断片

12. 天然の精製CryjII蛋白質が免疫グロブリンEに結合するよりも実質的に低い程度で免疫グロブリンEに結合する、請求の範囲第10項に記載の抗原性断片

13. 宿主細胞が大腸菌である、請求の範囲第10項に記載の単離したCryjII蛋白質。

14. CryjII蛋白質又は少なくともその1断片の製造方法であって、下記の工程：

a. CryjII蛋白質又はその断片をコードするDNA配列でトランスフォームした宿主細胞を適当な培地で培養してCryjII蛋白質又は少なくともその1断片を含む細胞及び培地の混合物を生成し、そして

b. 前記の混合物を精製して実質的に純粋なCryjII蛋白質又は少なくともその1断片を生成する

ことを含む、上記の方法。

15. CryjIIの全部又は一部をコードするヌクレオチド配列含む核酸でトランスフォームした宿主細胞中で合成したCryjII蛋白質又はその少なくとも1断片を含む蛋白質調製物。

16. 前記のCryjIIの少なくとも1断片が抗原性断片である、請求の範囲第15項に記載の蛋白質調製物。

17. 化学的に合成したCryjII蛋白質又はその少なくとも1断片を含む蛋白質調製物。

18. 前記のCryjII蛋白質が図4に示すアミノ酸配列（配列番号：2）を含む、請求の範囲第15項に記載の蛋白質調製物。

19. 前記のCryjII蛋白質が図4に示すアミノ酸配列（配列番号：2）を含む、請求の範囲第17項に記載の蛋白質調製物。

20. 少なくとも1つのCryjIIのT細胞エピトープを含む単離したペプチド。

21. 最小免疫グロブリンE刺激活性としての、請求の範囲第20項に記載の単離したペプチド。

22. 杉花粉アレルゲンに特異的な免疫グロブリンEに結合しないか又は該免疫グロブリンへの結合が起きる場合でもかかる結合がマスト細胞若しくは好塩基球からのヒスタミンの放出を生じない、請求の範囲第20項に記

載の単離したペプチド。

23. 天然の精製CryjII蛋白質が免疫グロブリンEに結合するよりも実質的に低い程度で免疫グロブリンEに結合する、請求の範囲第20項に記載の単離したペプチド。

24. 単離したCryjII蛋白質又はその抗原性断片であって、それを投与された杉花粉に感受性の個人において、その個人の杉花粉アレルゲンに対するアレルギー応答を調節する、上記の蛋白質又はその抗原性断片。

25. 個人の杉花粉アレルゲンに対するB細胞応答、個人の杉花粉アレルゲンに対するT細胞応答、又は個人の杉花粉アレルゲンに対するB細胞応答及びT細胞応答の両方を調節する、請求の範囲第24項に記載の単離したCryjII蛋白質又は抗原性断片。

26. 杉花粉に感受性の個人に投与したときにその個人のCryjIIに対するアレルギー応答を減じる修飾CryjII蛋白質又はその少なくとも1修飾断片。

27. 単離したCryjII蛋白質又はその少なくとも1断片及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を含む治療用組成物。

28. 前記のCryjII蛋白質が図4に示したアミノ酸配列（配列番号：1）を含む、請求の範囲第27項に記載の治療用組成物。

29. 杉花粉アレルゲン、又は杉花粉アレルゲンと免疫学的に交差反応性のアレルゲンに感受性の個人におい

て、その個人に治療上有効な量の請求の範囲第27項に記載の組成物を投与することを含む、当該抗原に対する感受性を治療する方法。

30. 個人における杉花粉アレルゲンに対する感受性を検出する方法であって、その個人から得た血液試料を、請求の範囲第1項に記載の核酸でトランスフォームした宿主細胞にて生成するか又は化学的に合成した単離したCryjII蛋白質又は

その抗原性断片と、血液成分の蛋白質若しくはその断片との結合に適当な条件下で合わせ、そしてかかる結合が起きる程度を測定することを含む、上記の方法。

31. 結合が起きる程度を、T細胞機能、T細胞増殖、B細胞機能、蛋白質又はその断片の血液中に存在する抗体又はその断片に対する結合を評価することにより測定する、請求の範囲第30項に記載の方法。

32. CryjII蛋白質又はその少なくとも1つの抗原性断片と特異的に反応性である、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体又はそれらの免疫学的に反応性の断片。

33. ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定して約40kDの分子量を有する、杉花粉から単離したCryjII蛋白質。

34. ATCC寄託番号69105を有する、CryjIIのcDNA挿入物を含むベクターでトランスフォームした宿主細胞。

35. 蛋白質アレルゲンCryjIIの少なくとも1つのエピ

トープを有するポリペプチドをコードするDNAを含む、組換えDNA分子。

## 【発明の詳細な説明】

杉花粉由来のアレルゲン性蛋白質及びペプチド

発明の背景

遺伝的素因を有する個人（人口の約 10% に及ぶ）は、彼らがさらされる種々の環境起源の抗原に対して過剰感作（アレルギー性）となる。それらの即時型及び／又は遅延型の過敏症を誘発し得る抗原はアレルゲンとして知られている（King, T.P., Adv. Immunol. 23:77-105, (1976)）。枯草熱、喘息及び発疹の症状を含むアナフィラキシー又はアトピーは、即時型アレルギーの一形態である。それは、草、木、雑草、動物の鱗屑、昆虫、食物、薬物及び化学物質等の種々のアトピー性アレルゲンによって引き起こされ得る。

アトピー性アレルギーに関係する抗体は、主として免疫グロブリン IgE クラスに属する。IgE はマスト細胞及び好塩基球と結合する。特定のアレルゲンと、マスト細胞又は好塩基球に結合した IgE との結合により、IgE は、その細胞上で架橋されて IgE-抗原相互作用の生理的効果を生じ得る。これらの生理的効果は、他の物質のうちで、ヒスタミン、セロトニン、ヘパリン、エオシン好性白血球及び／又はロイコトリエンに対する走化性因子、C4、D4 及び E4 の放出を含み、これらは、気管支平滑筋細胞の長期の収縮を引き起こす

（Hood, L.E. 等、Immunology（第 2 版）、The Benjamin/Cumming Publishing Co., Inc. (1984)）。これらの放出された物質は、IgE と特異的アレルゲンとの結合により引き起こされるアレルギー性症状を生じるメディエーターである。それらを介してアレルゲンの効果は現れる。かかる効果は、その性質が、抗原が体内に侵入した経路及び IgE のマスト細胞又は好塩基球への付着パターンによって、全身性であり又は局所的である。局所的出現は、一般に、アレルゲンが体内に侵入した場所の上皮表面に起きる。全身性効果は、アナフィラキシー（アナフィラキシー性ショック）を含み、それは、循環（血管内）抗原に対する IgE-好塩基球の応答の結果である。

杉（スギ：Cryptomeria japonica）花粉症は、日本における最も重大なアレルギー性疾患の一つである。この病気を患っている患者数は増加中であり、幾つか

の地域では人口の10%より多くが影響を受けている。杉花粉抽出物を投与してアレルギーに対して除感作することによる杉花粉症の治療が試みられてきた。しかしながら、杉花粉抽出物を用いる除感作は、高投与量で用いるならばそれがアナフィラキシーを誘出し得るという欠点を有しており、他方、低投与量を用いてアナフィラキシーを回避した場合には治療はその抽出物に対する寛容を確立するために数年間継続しなければならない。

杉花粉に由来する主要なアレルギーは精製され、スギ

塩基性蛋白質 (SBP) 又はCryjIと呼ばれている。この蛋白質は、分子量41～50kDaでpI8.8の塩基性蛋白質であることが報告されている。部分的に異なるグリコシレーションのために、このアレルギーの多くのイソ型があるらしい (Yasueda等 (1983) J. Allergy Clin. Immunol. 71:77-86; 及びTaniai等 (1988) FEBS Letters 239:329-332)。CryjIのN末端の最初の20アミノ酸の配列及び16アミノ酸の内部配列が決定された (Taniai、前出)。

第2のアレルギーが、最近、Cryptomeria japonica (杉) の花粉から単離された (Sakaguchi等 (1990) Allergy 45:309-312)。このCryjIIと呼ばれるアレルギーは、非還元及び還元条件下でドデシル硫酸ナトリウムゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にてアッセイした場合、それぞれ、約37kDa及び45kDaの分子量を有すると報告された (Sakaguchi等、前出)。CryjIIはCryjIと免疫学的交差反応性を有しないことが見出された (Sakaguchi (1990) 前出; Kawashima等 (1992) Int. Arch. Allergy Immunol. 98:110-117)。杉花粉による殆どの患者は、CryjI及びCryjIIの両者に対するIgE抗体を有することが見出された。しかしながら、アレルギー患者の29%は、CryjIとのみ反応するIgEを有し、アレルギー患者の14%は、CryjIIとのみ反応するIgEを有した (Sakaguchi (1990)、前出)。CryjIIの等電点電気泳動は、この蛋白質が、CryjIIに対するpI

8.6～8.8と比べて、9.5を超えるpIを有することを示した (Sakaguchi (1990)、前出)。更に、報告されたCryjIIについてのNH<sub>2</sub>末端配列、NH<sub>2</sub>

AlaIleAsnIlePheAsnValGluLysTyr-COOHは、CryjIIについて報告されたものと一致しなかった (Sakaguchi (1990)、前出)。

杉花粉症アレルゲンに注意が払われたにもかかわらず、人々に悪影響を及ぼす原因であるアレルゲンの特定又は特性決定は非常に不完全である。現在の脱感作治療は、もし高投与量の花粉抽出物を投与するならば付随するアナフィラキシーの危険を伴う花粉抽出物を用いる治療、又は低投与量の花粉抽出物を投与する場合に長期の脱感作時間を要する治療を含んでいる。

#### 発明の要約

本発明は、*Cryptomeria japonica* 主要花粉アレルゲンCryjIIをコードする核酸配列及びその断片を提供する。本発明は又、CryjIIをコードする核酸配列又は少なくともその1断片でトランスフォームされた宿主細胞内で産生された精製されたCryjII及び少なくともその1断片及び合成により調製したCryjIIの断片を提供する。ここで用いる場合、CryjIIの完全アミノ酸配列をコードする核酸配列の断片とは、CryjII及び／又は成熟CryjIIの完全アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列よりも少ない塩基を有する核酸配列のことをいう。CryjII及びその

断片は、杉花粉症を診断し、治療し及び予防するために有用である。この発明を、請求の範囲に一層詳細に記載し且つその好適具体例を以下の説明に記載する。

#### 図面の簡単な説明

図1aは、非還元条件下での、CryjIIのSDS-PAGE (12%) 分析を示している。

図1bは、還元条件下での、CryjIIのSDS-PAGE (12%) 分析を示している。

図2は、10mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 中の1ステップのNaCl勾配にて溶出したCryjIIのモノSカラムクロマトグラフィーの結果を示している。

図3は、還元条件下で分析したCryjIIの精製したサブ画分のSDS-PAGE (12%) を示している。



図4は、CryjIIをコードする核酸配列（配列番号1）及び演繹されたアミノ酸（配列番号2）を示している。

図5は、CryjIIの演繹されたアミノ酸配列を示している。

図6は、実施例2で論じるように、Sakaguchi等、前出により規定されたCryjIの10個のアミノ酸の配列（配列番号6）と並べた蛋白質配列分析により決定したCryjIIのロング型（配列番号4）及びショート型（配列番号5）のNH<sub>2</sub>末端アミノ酸配列を示している（配列番号3）。

図7は、モノクローナル抗体4B11及び7人の患者（バッチ1）の血漿IgEの被覆抗原としての精製CryjIに対する結合応答を示す直接ELISAアッセイの結果のグラフ表示である。

図8は、モノクローナル抗体4B11及び7人の患者（バッチ1）の血漿IgEの被覆抗原としての天然の精製CryjIIに対する結合応答を示す直接ELISAアッセイのグラフ表示である。

図9は、モノクローナル抗体4B11及び7人の患者（バッチ1）の血漿IgEの被覆抗原としての組換えCryjII（rCryjII）に対する結合応答を示す直接ELISAアッセイのグラフ表示である。

図10は、8人の患者（バッチ2）の血漿IgEの天然の精製CryjIに対する結合応答を示す直接ELISAアッセイのグラフ表示である。

図11は、8人の患者（バッチ2）の血漿IgEの天然の精製CryjIIに対する結合応答を示す直接ELISAアッセイのグラフ表示である。

図12は、8人の患者（バッチ2）の血漿IgEの組換えCryjIIに対する結合応答を示す直接ELISAアッセイのグラフ表示である。

図13は、8人の患者（バッチ3）の血漿IgEの天然の精製CryjIに対する結合応答を示す直接ELISAアッセイのグラフ表示である。

図14は、8人の患者（バッチ3）の血漿IgEの天然の精製CryjIIに対する結合応答を示す直接ELISAアッセイのグラフ表示である。

図15は、8人の患者（バッチ3）の血漿IgEの組換えCryjIIに対する結合応答を示す直接ELISAアッセイのグラフ表示である。

図16は、患者の血漿試料（バッチ1～3）について行なったMAST評点及び図7～15に示した直接ELISAの結果を要約した表である（陽性応答は、（+）符合で示され、各抗原に対する陽性応答の数は、各欄の下に示してある）。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、CryjII（杉花粉に見出されるアレルゲン）をコードする核酸配列を提供する。図4に示すCryjIIをコードする核酸配列（配列番号：1）は、514アミノ酸の蛋白質をコードしている。CryjIIの演繹されたアミノ酸配列を図4及び5に示す（配列番号：2）。天然の精製CryjIIの直接蛋白質配列分析は、2つの別々の重複するNH<sub>2</sub>末端配列を生じたが、これらは、ロング及びショートと呼ばれ、それぞれ、図4、5及び6のアミノ酸46～89（配列番号：4）及び51～89（配列番号：5）に対応している。以前にSakaguchi等、前出によりCryjIIについて規定された10個のアミノ酸の配列NH<sub>2</sub>-AlaIleAsnIlePheAsnValGluLysTry-COOH（配列番号：6）は、図4及び6のアミノ酸55～64に対応している。完全長のCryjII配列は、20個のシステイン残基及び3つの潜在的なAsn-Xxx-Ser/Thrコンセンサス配列とのN-結合グリコシル化部位を含んでいる。PCGene, Intelligenetics（カリフォルニア、Mountain View在）に含まれるプログラムによれば、CryjIIのロング及びショート型により規定されるNH<sub>2</sub>末端を有する蛋白質は、それぞれ469及び464アミノ酸を含み、予想分子量51.5kDa（ロング）及び50.9kDa（ショート）を有する。CryjIIのロング型を表すアミノ酸配列は、図4に示すように塩基177～1586に及ぶヌクレオチド配列（配列番号：7）によりコードされ、CryjIIのショート型を表すアミノ酸配列は、図4に示すように192～1586に及ぶヌクレオチド配列（配列番号：8）によりコードされる。完全長のCryjIIをコードするCDNA挿入物を含むベクターでトランスフォームした宿主細胞を、American Type Culture CollectionにATCC No

69105で寄託した。

CryjIIの断片をコードする核酸配列の断片も又、この発明の範囲内にある。この発明の範囲内の断片は、CryjIIの部分にコードするものを含み、これらは、哺乳動物好ましくはヒトにおいて免疫応答を誘発する（最小量のIgEの刺激；IgEの結合；IgG及びIgM抗体の産生の誘出；又は増殖及び／又はリンホカイン分泌及び／又はT細胞アネルギーの誘導等のT細胞応答の誘出

等）。前述のCryjIIの断片を、ここでは、抗原性断片という。この発明の範囲内の断片は、CryjIIと交差反応性のアレルゲンを検出するスクリーニングプロトコルにおいて用いるために、他の植物種からの核酸とハイブリダイズし得るものをも含む。ここで用いる場合、CryjIIをコードする核酸配列の断片とは、CryjII及び／又は成熟CryjIIの完全アミノ酸配列をコードする核酸配列より少ない塩基を有する核酸配列をいう。一般に、CryjIIの断片をコードする核酸配列を、成熟蛋白質をコードする塩基から選択するが、ある場合には、この発明の核酸配列のリーダー配列部分からの断片の全部又は一部を選択することが望ましい。この発明の核酸配列は又、CryjII又はその断片のクローニング、発現又は精製に有用なリンカー配列、改変された制限エンドヌクレアーゼ部位及びその他の配列をも含む。

CryjIIをコードする核酸配列は、*Cryptomeria japonica*植物から得ることが出来る。出願人は、新鮮な花粉及び雄蕊を有する球果がCryjII mRNAの良い源であることを見出した。*Cryptomeria japonica*は杉の周知の種であり、植物材料は野生、耕作又は装飾用植物から得ることが出来る。CryjIIをコードする核酸配列は、ここに開示する方法又は遺伝子の単離及びクローニングのための他の任意の適当な方法を用いて得ることが出来る。この発明の核酸配列はDNA又はRNAであってよい。

本発明は、この発明の核酸配列を発現するための発現ベクター及びトランスフォームした宿主細胞を提供する。CryjIIをコードする核酸配列又はそれらの少なくとも1断片を*E. coli*等の細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルス）、酵母、

又はチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）等の哺乳動物細胞中で発現させることが出来る。適当な発現ベクター、プロモーター、エンハンサー及び他の発現制御要素は、Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, ニューヨーク（1989）中に見出すことが出来る。他の適当な発現ベクター、プロモーター、エンハンサー及び他の発現要素は、当業者には公知である。哺乳動物、酵母又は昆虫細胞内での発現は、組換え物質の部分的な又は完全なグリコシレーション及び鎖間又は鎖内ジスルフィド結合の形成へと導く。酵母内での発現のための適当なベクターは、YepSec1（Baldari等（1987）Embo J. 6:229-234）；pMFa（Kurjan及びHerskowitz（1982）Cell 30:933-943）；JRY88（Schultz等（1987）Gene 54:113-123）及びpYES2（Invitrogen Corporation カリフォルニア, San Diego 在）を含む。これらのベクターは自由に入手することが出来る。バキュロウイルス及び哺乳動物発現系も又入手可能である。例えば、バキュロウイルス系は、昆虫細胞中での発現用に市販されており（カリフォルニア, San Diego 在, PharMingen）、他方、pMSGベクターは、哺乳動物細胞内

での発現用に市販されている（ニュージャージー, Piscataway 在, Pharmacia）。

E. coli内での発現のためには、適当な発現ベクターは、他のものの内で、pTRC（Amann等（1988）Gene 69:301-315）；pGEX（オーストラリア, Melbourne 在, Amrad Corp.）；pMAL（マサチューセッツ, Beverly 在, N.E. Biolabs）；pRIT5（ニュージャージー, Piscataway 在, Pharmacia）；pET-11d（ウィスコンシン, Madison 在, Novagen）Jameel等、（1990）J. Virol. 64:3963-3966；及びpSEM（Knapp等（1990）BioTechniques 8:280-281）を含む。例えば、pTRC及びpET-11dの利用は、未融合蛋白質の発現へと導く。pMAL、pRIT5、pSEM及びpGEXの利用は、マルトースE結合蛋白質（pMAL）、蛋白質A（pRIT5）、切り詰めたβ-ガラクトシダーゼ（pSEM）又はグルタチオンS-トランスフェラーゼ（pGEX）に融合したアレルゲンの発現へと導くであろう。CryjII断片又はその断片が融合蛋白質として発現される場合には、キャリアー蛋白質とCryjII又はその断片との間の融合点に酵素開裂部位を導入することは特に有利である。次いで、CryjII又はその断片を融合蛋白質からその酵素部位にお

ける酵素間裂並びに蛋白質及びペプチド精製のための従来技術を用いる生化学的精製によって回収することが出来る。適当な酵素間裂部位は、血液凝固因子 X a 又はトロンビンに対するものを含み、それに対する適当な酵素は、例えば、ミズーリ、St. Louis 在、Sigma Chemical Company 及びマサチューセツツ、

Beverly 在、N. E. Biolabs から入手することが出来る。種々のベクターは、構成的発現又は例えば IPTG 誘導 (PRTCmann 等、(1988) 前出; pET-11d, ウィスコンシン、Madison 在、Novagen) 若しくは温度誘導 (pRIT5、ニュージャージー、Piscataway 在、Pharmacia) を用いる誘導可能な発現を可能にする種々のプロモーター領域を有する。組換えにより発現される蛋白質を分解する能力を変えた種々の E. coli 宿主中で組換え Cryj II を発現させることも適当であろう (例えば、米国特許第 4, 758, 512 号)。或は、E. coli により優先的に利用されるコドンを用いるように核酸配列を変えることは有利であり得る (ここに、かかる核酸の変化は、発現されるアミノ酸配列に影響を与えないものである)。

宿主細胞は、リン酸カルシウム若しくは塩化カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、又は電気穿孔法等の従来技術を用いて、この発明の核酸配列を発現するようにトランスフォームすることが出来る。宿主細胞をトランスフォームするための適当な方法は、Sambrook 等、前出及び他の実験室用テキスト中に見出され得る。この発明の核酸配列は又、標準的技術を用いて合成することも出来る。

本発明は又、精製した杉花粉アレルゲン Cryj II 又は少なくともその 1 断片を製造する方法をも提供し、それは、杉花粉アレルゲン Cryj II 又は少なくともその 1 断片をコードする DNA 配列でトランスフォームした宿主細胞

を適当な培地中で培養して該杉花粉アレルゲン Cryj II 若しくはその少なくとも 1 断片を含む細胞及び培地の混合物を生成し;そしてその混合物を精製して実質的に純粋な杉花粉アレルゲン Cryj II 又はその少なくとも 1 断片を生成する工程を含んでいる。Cryj II 又はその少なくとも 1 断片をコードする DNA を含む発現ベクターでトランスフォームした宿主細胞をその宿主細胞に適した培地中で培養す

る。CryjII蛋白質及びペプチドは、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動及びCryjII若しくはその断片に特異的な抗体を用いる免疫精製を含むペプチド又は蛋白質を精製するための公知技術を用いて、細胞培養培地、宿主細胞又はその両者から精製することが出来る。単離した及び精製したという用語は、ここでは、交換可能であって、組換えDNA技術又は化学的前駆体により生成したときに、実質的に細胞性物質若しくは培養培地を含まないペプチド、蛋白質、蛋白質断片及び核酸配列のことをいう。

CryjII蛋白質は又、実施例1に記載するように杉花粉からも単離し得る。ここでは、杉花粉から直接単離されたCryjIIは「天然の精製」CryjIIとして言及する。この発明の天然の精製CryjIIが少なくとも80%の純度であること、一層好ましくは少なくとも90%の純度であること、更に好ましくは均質（少なくとも99%）にまで精製されていることは、好ましいことである。

この発明の他の面は、杉花粉アレルゲンCryjII又はその少なくとも1断片（杉花粉アレルゲンCryjIIの全部又は一部をコードするDNA配列でトランスフォームした宿主細胞内で合成されたもの、或は化学合成したもの）、及び精製した杉花粉アレルゲンCryjII蛋白質又はこれらの少なくとも1つの抗原性断片（この発明の核酸配列でトランスフォームした宿主細胞内で生成したもの、或は化学合成したもの）を含む調製物を提供する。この発明の好適具体例において、CryjII蛋白質は、少なくとも成熟CryjII蛋白質をコードする核酸配列でトランスフォームした宿主細胞内で産生される。

CryjIIの抗原性断片は、例えば、かかるペプチドをコードするこの発明の対応する核酸配列の断片から組換えにより生成されたペプチドをスクリーニングするか、又は、当業者に公知の技術を用いて化学的に合成されたペプチドをスクリーニングするか、又は、このアレルゲンの化学的開裂により生成したペプチドをスクリーニングすることによって得ることが出来る。このアレルゲンは、これらのペプチドの重複を有しない所望の長さの断片に自由に分割することが出来、或は好ましくはこれらのペプチドの重複を有しない所望の長さの断片に自由に分割することが出来、或は好ましくは所望の長さの重複する断片に分割することが出来

る。これらの断片を試験して、それらの抗原性（例えば、実施例7で論ずるような、断片のT細胞増殖等の免疫応答を誘導する能力）を

測定する。

抗原性断片は又、Hi11等の論文、Journal of Immunology, 147:184-197 (1991)により論じられたようなアルゴリズムを用いても予想し得る。Hi11等により論じられたアルゴリズム等のT細胞活性を導出するペプチドを予想するためのアルゴリズムは、蛋白質配列に基いており、そこでは、その配列内のあるパターンはMHCに結合しそうでありそれ故にT細胞エピトープを含み得る。実施例7で論じるCryjIIA及びCryjIIB等のアルゴリズムにより予想されたペプチドを、実施例7で論じる様にして組換え又は合成により生成してT細胞活性について試験することが出来る。

もし杉花粉アレルゲン例えばCryjIIの断片を治療目的に利用すべきであるならば、刺激（即ち、増殖又はリンホカイン分泌）等のT細胞応答を導出することが出来及び／又はT細胞アネルギーを誘導することの出来る杉花粉アレルゲンの断片は特に望ましく、最小IgE刺激活性を有する杉花粉の断片も又望ましい。更に、治療目的のために、精製杉花粉アレルゲン例えばCryjII及びそれらの断片は、好ましくは、杉花粉に特異的なIgEに結合せず、或は天然の精製杉花粉アレルゲンがかかるIgEに結合する程度より実質的に僅かしかかかるIgEに結合しない。もし精製杉花粉アレルゲン又はその断片がIgEに結合するならば、かかる結合がマスト細胞又は好塩基球からのメディエーター（例えば、ヒスタミン）

の放出を生じないことが望ましい。最小IgE刺激活性は、天然のCryjII蛋白質により刺激されるIgE生成の量より少ないIgE刺激活性のことをいう。

T細胞刺激活性を有し、従って、少なくとも1つのT細胞エピトープを含む本発明の単離した抗原性断片又はペプチドは、特に望ましい。T細胞エピトープは、アレルギ-の臨床症状の原因と成る蛋白質アレルゲンに対する免疫応答の開始及び持続に関与すると考えられている。これらのT細胞エピトープは、抗原提示

細胞の表面上の適当なHLA分子に結合して関連T細胞サブポピュレーションを刺激することによりヘルパーT細胞のレベルで初期事象の引き金を引くと考えられる。これらの事象は、T細胞増殖、リンホカイン分泌、局所的炎症反応、追加の免疫細胞のその部位への補充及び抗体産生へ導くB細胞カスケードの活性化へと導く。これらの抗体の1つのイソ型であるIgEは、アレルギー症状の発達に基本的に重要であり、その産生は事象のカスケードの初期に、ヘルパーT細胞のレベルで、分泌されたリンホカインの性質により影響を受ける。エピトープは、レセプターによる認識の基本要素又は最小単位であり（特に、免疫グロブリン、組織適合抗原及びT細胞レセプター）、このエピトープはレセプター認識に必須のアミノ酸を含んでいる。エピトープ特にT細胞エピトープのアミノ酸配列を真似るアミノ酸配列及び蛋白質アレルギーに対するアレルギー応答を調節するアミノ酸配列（Cryj

IIに対するアレルギー応答を下方制御し得るものを含む）は、この発明の範囲内にある。

実施例7で論じるように、杉花粉アレルギーに感受性の個人（即ち、杉花粉アレルギーに対するIgE媒介の免疫応答を有する個人）から得たT細胞をアレルギーから誘導したペプチドと共に培養し、このペプチドへの応答においてT細胞の増殖が起きるかどうかを、例えばトリチウム化チミジンの細胞への取り込みによる測定により測定することによって、ヒトT細胞刺激活性を試験することが出来る。ペプチドに対するT細胞による応答についての刺激インデックスを、ペプチドに対する応答における最大CPMを対照のCPMで除したものとして計算することが出来る。バックグラウンドレベルの2倍以上の刺激インデックス（S. 1.）を「陽性」と考える。陽性結果を用いて、試験した各ペプチドに対する平均刺激インデックスを計算する。この発明の好適ペプチドは、少なくとも1つのT細胞エピトープを含み且つ2.0以上の平均T細胞刺激インデックスを有する。2.0以上の平均T細胞刺激インデックスを有するペプチドは、治療剤として有用であると考えられる。図17に示すように、CryjIIペプチドのCryjIIA及びCryjIIBは、少なくとも2の平均刺激インデックスを有し、それ故に、予想される



ように、少なくとも1つのT細胞エпитープを含む。

杉花粉からの精製蛋白質アレルゲン又はそれらの好適

な抗原性断片は、杉花粉感受性の個人又は杉花粉アレルゲンと交差反応性のアレルゲンに対してアレルギー性の個人に投与した場合、その個人の杉花粉若しくはかかる交差反応性のアレルゲンに対するアレルギー応答を調節し、好ましくは、その個人のそのアレルゲンに対するB細胞応答、T細胞応答又はB細胞及びT細胞応答の両者を調節することが出来る。ここで用いる場合、杉花粉アレルゲンに感受性の個人のアレルギー応答の調節は、標準臨床手順により測定したときに、アレルゲンに対する非応答性又は症状の減少として定義することが出来る（例えば、Varney等、British Medical Journal, 302:265-269 (1990)を参照されたい）（杉花粉誘発性の喘息症状の減少を含む）。ここでいう場合、症状の減少は、個人がこの発明のペプチド若しくは蛋白質を用いる治療管理を完了した後でのアレルゲンに対する任意のアレルギー応答の減少を含む。この減少は、主観的なものであって良い（即ち、患者がアレルゲンの存在下で一層快適に感じればよい）。症状の減少は又、公知の標準皮膚試験を用いて臨床的に測定することも出来る。

精製したCryj II蛋白質又はその断片を、好ましくは、Tamura等 (1986) Microbiol. Immunol. 30:883-896又は米国特許第4, 939, 239号に開示されたマウスモデル等の杉花粉の哺乳動物モデルにて、又はChiba等 (1990) Int. Arch. Allergy Immunol. 93:83-88に開示された蓋長類モデルにて試験する。蛋白質又はその断片に対するI

gE結合についての初期スクリーニングは、実験動物又はヒトのボランティアに対するスクラッチ試験又は皮内皮膚試験によって、又はRAST（放射アレルゲン吸着試験）、RAST阻害、ELISAアッセイ、放射免疫アッセイ（RIA）又はヒスタミン放出にて行なうことが出来る。

アレルギーの個人を、本発明の精製した蛋白質アレルゲン又は本発明の抗原性断片（少なくとも1つのT細胞エпитープを含み、蛋白質アレルゲンから誘導さ

れる)にさらすと、適当なT細胞サブポピュレーションを寛容化し又は免疫性減少させて、それらを蛋白質アレルギーに対して非応答性にし且つこのようにさらされても免疫応答の刺激に関与しないようにすることが出来る。更に、少なくとも1つのT細胞エピトープを含むこの発明の蛋白質アレルギー又は本発明の抗原性断片の投与は、天然の蛋白質アレルギー又はその部分にさらすことと比較してリンホカイン分泌プロファイルを調節することが出来る(例えば、IL-4の減少及び/又はIL-2の増加を生じる)。更に、かかる抗原性断片又は蛋白質アレルギーにさらすことは、通常そのアレルギーに対する応答に関与するT細胞サブポピュレーションに影響を与えて、それらのT細胞が通常そのアレルギーにさらされる部位(例えば、鼻粘膜、皮膚及び肺)から離れて治療用の断片又は蛋白質アレルギーの投与部位に向かうようにすることが出来る。このT細胞サブポピュレーションの

再分配は、アレルギーに通常さらされる部位において通常の免疫応答を刺激する患者の免疫系の能力を改善し又は減少させ、アレルギー症状の減少を生じる。

単離したCryjII蛋白質及びそれらから導かれる断片又は部分を、杉花粉アレルギー又は交差反応性蛋白質アレルギーに対するアレルギー反応を診断し、治療し及び予防する方法において用いることが出来る。従って、本発明は、単離した杉花粉アレルギーCryjII又はその少なくとも1断片(CryjII又はその少なくとも1断片を発現するようにトランスフォームした宿主細胞にて生成したもの)及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を含む治療用組成物を提供する。この発明の治療用組成物は又、合成により調製したCryjII又はその少なくとも1断片及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を含んでもよい。脱感作されるべき個人への本発明の治療用組成物の投与は、公知技術を用いて行なうことが出来る。CryjII、JunvI若しくはJunsI蛋白質又はそれらの少なくとも1断片を例えば適当な希釈剤、キャリアー及び/又はアジュバントと組合せて個人に投与することが出来る。製薬上許容し得る希釈剤は塩溶液及び緩衝剤水溶液を含む。製薬上許容し得るキャリアーは、ポリエチレングリコール(Wie等(1981) Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 64:84-99)及びリポソーム(Strejan等(1984) J. Neuroi

mmunol 7:27) を含む。T細胞アレルギーを誘導する目的には、この治療用組成物を、好ましく

は、非免疫原形態（例えば、アジュバントを含まない）で投与する。かかる組成物は、一般に、注射（皮下、静脈等）、経口投与、吸入、経皮適用又は直腸投与により投与する。この発明の治療用組成物を、杉花粉感受性の個人に、その個人の杉花粉に対する感受性を減じる（即ち、アレルギー応答を減じる）のに十分な投与量及び期間で投与する。この治療用組成物の有効量は、その個人の杉花粉に対する感受性の程度、年齢、性別及び体重、並びにCryjII蛋白質又はその断片がその個人における抗原応答を誘出する能力等の因子によって変化する。

CryjII cDNA（又は該cDNAが転写されたmRNA）又はその一部を用いて、任意の種類又は型の植物において類似の配列を同定することが出来、従って、CryjII cDNA若しくはmRNA又はそれらの部分にハイブリダイズするだけ十分な相同性を有する配列（例えば、*Cupressus sempervirens*, *Juniperus sabioides*等のアレルゲンからのDNA）を低緊縮条件下で同定し又は「引き出す」ことが出来る。それらの十分な相同性（一般に40%を超える）を有する配列を、ここに記載した方法を用いて、更なる評価のために選択することが出来る。或は、高緊縮条件を用いることが出来る。この方法では、本発明のDNAを用いて、他の型の植物、好ましくは関連する科、属又は種（例えば、*Juniperus*又は*Cupressus*）において、杉花粉アレルゲンCryjIIのアミノ酸配列に類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする配列を同定することが出来、それ故、他の種におけるアレルゲンを同定することが出来る。従って、本発明は、CryjIIを含むだけでなく、本発明のDNAとハイブリダイズするDNAによりコードされる他のアレルゲンをも含む。この発明は、更に、以前に同定されていない単離したアレルゲン性蛋白質又はそれらの断片を含み、それらは、抗体交差反応（単離したアレルゲン性蛋白質又はそれらの断片はこの発明の蛋白質及びペプチドに特異的な抗体に結合することが出来る）により、又はT細胞交差反応（単離したアレルゲン性蛋白質又はそ

これらの断片はこの発明の蛋白質及びペプチドに特異的なT細胞を刺激することが出来る)等により、免疫的にCryjII又はその断片と関係している。

本発明のcDNAによりコードされる蛋白質又はペプチドを、例えば、「精製した」アレルゲンとして用いることが出来る。かかる精製したアレルゲンは、杉花粉症の診断及び治療のための鍵となる試薬であるアレルゲン抽出物の標準化において有用である。更に、CryjIIの核酸配列に基づくペプチドを用いることにより、抗ペプチド抗体又はモノクローナル抗体を、標準的方法を用いて作成することが出来る。これらの血清又はモノクローナル抗体を用いてアレルゲン抽出物を標準化することが出来る。

本発明のペプチド及び蛋白質の利用により、首尾一貫した、十分に規定された組成及び生物学的活性を有する製剤を作成して治療目的のために投与することが出来る(例えば、杉感受性の個人のかかる木々の花粉に対するアレルギー応答を調節する等)。かかるペプチド又は蛋白質の投与は、例えば、CryjIIアレルゲンに対するB細胞応答、CryjIIアレルゲンに対するT細胞応答又はB及びT細胞の両方の応答を調節することが出来る。精製したペプチドは又、*Cryptomeria japonica*アレルギーの免疫療法の機構を研究し及び免疫療法において有用な改変した誘導体又はアナログをデザインするために用いることも出来る。

他の人々の仕事は、一般に、アレルゲンの高投与量が最良の結果(即ち、最大の症状軽減)を生じるということを示した。しかしながら、多くの人々は、アレルゲンに対するアレルギー反応のために、アレルゲンの大量投与に耐えられない。対応する天然のアレルゲンと同じかそれより増大された治療特性を有するが減少した副作用(特に、アナフィラキシー反応)を有する改変したペプチド又は改変したアレルゲンが生成されるような方法で、天然のアレルゲンの改変をデザインすることが出来る。これらは、例えば、本発明の蛋白質又はペプチド(例えば、CryjIIのアミノ酸配列の全部又は一部を有するもの)、又は改変した蛋白質若しくはペプチド、又は蛋白質若しくはペプチドのアナログであってよい。

溶解度を増し、治療若しくは予防効果又は安定性(例えば、生体外での貯蔵寿命及びイン・ビボでの蛋白質分解に対する抵抗性)を増大させる等の目的で、こ

の発明の蛋白質又はペプチドの構造を改変することは可能である。免疫原性を改変し及び／又はアレルゲン性を減じるために、アミノ酸置換、欠失又は付加等によってアミノ酸配列が変化した、或は、同じ目的のために成分が加えられた、改変した蛋白質又はペプチドを生成することが出来る。例えば、T細胞エпитープ機能に必須のアミノ酸残基を公知の技術（例えば、各残基の置換及びT細胞反応性の有無の測定）を用いて測定することが出来る。

例えば、ペプチドを、強い増殖応答の誘導能力を伴わ

ないでT細胞アネルギーを誘導し及びMHC蛋白質に結合する能力、並びに免疫原形態での投与時の増殖応答を維持するように改変することが出来る。この場合には、T細胞レセプターに対する重大な結合残基を、公知の技術（例えば、各残基の置換及びT細胞反応性の存否の測定）を用いて決定することが出来る。T細胞レセプターとの相互作用に必須であることが示されたそれらの残基を、必須アミノ酸を他のもの好ましくはその存在がT細胞反応性を増大し、関連MHCへの結合を除去はしないが減少させる類似のアミノ酸残基で置換（保存的置換）することによって改変することが出来る。

更に、この発明のペプチドを、MHC蛋白質複合体との相互作用に必須であるべきことが示されたアミノ酸を他のもの好ましくはその存在がT細胞活性を増大し、除去はしないが減少させ又は該活性に影響しないことが示された類似のアミノ酸残基と置換（保存的置換）することによって改変することが出来る。更に、MHC蛋白質複合体との相互作用に必須でないがMHC蛋白質複合体にやはり結合するアミノ酸残基を、その取り込みがT細胞反応性を増大し、影響せず又は除去はしないが減少させる他のアミノ酸で置換することによって改変することが出来る。非必須アミノ酸についての好適なアミノ酸置換は、アラニン、グルタミン酸又はメチルアミノ酸での置換を含む（但し、それらに限定はされない）。

蛋白質又はペプチドの改変の他の例は、システイン残

基を好ましくはアラニン、セリン、スレオニン、ロイシン又はグルタミン酸で置換してジスルフィド結合を介する2量体形成を最少化することである。この発明

のペプチドの改変の他の例は、このペプチドのアミノ酸側鎖の化学的改変又は環化である。

安定性及び／又は反応性を増大するために、この発明の蛋白質又はペプチドを改変して、その蛋白質アレルゲンのアミノ酸配列に、自然の対立遺伝子変化から生じる1つ以上の多形を取り込むことも出来る。更に、Dアミノ酸、非天然アミノ酸又は非アミノ酸アナログを代用とし又は加えて、この発明の範囲内の改変した蛋白質又はペプチドを生成することが出来る。更に、本発明の蛋白質又はペプチドを、A.Sehonと共同研究者(Wie等、前出)のポリエチレングリコール(PEG)法を用いて改変してPEGと結合した蛋白質又はペプチドを生成することが出来る。更に、PEGを、この発明の蛋白質又はペプチドの化学合成中に加えることが出来る。蛋白質若しくはペプチド又はその部分の改変は又、還元／アルキル化(Tarr, Methods of Protein Microcharacter-ization, J.E.Silver編, Humana Press, Clifton, NJ, 155-194頁(1986)中)；アシル化(Tarr, 前出)；適切なキャリアーへの化学カップリング(Mishell及びShiigi編, Selected Methods in Cellular Immunology, WH Freeman, San Francisco, CA(1980)；米国特許第4,939,239号)；又は温和なホルマリン処理

(Marsh International Archives of Allergy and Applied Immunology, 41:199-215(1971))をも含むことが出来る。

この発明の蛋白質及びペプチドの精製を容易にし且つ溶解度を潜在的に増大させるために、そのペプチドの主鎖にレポーター基を加えることが出来る。例えば、ポリヒスチジンをペプチドに加えてそのペプチドを固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーで精製することが出来る(Hochuli, E.等, Bio/Technology, 6:1321-1325(1988))。更に、特異的なエンドプロテアーゼ開裂部位を、所望であれば、レポーター基とペプチドのアミノ酸配列との間に導入して無関係の配列を含まないペプチドの単離を促進することが出来る。蛋白質抗原に対して個人を上首尾に脱感作するためには、蛋白質若しくはペプチドの溶解度を、そのペプチドに官能基を付加することにより又は疎水性T細胞エпитープ若しくはこれらのペプチド中の疎水性エпитープを含む領域若しくはこの蛋白質若しくは

ペプチドの疎水性領域を含まないことによって、増大させることが必要であろう。

ペプチド内のT細胞エピトープの適当な抗原プロセッシングを潜在的に補助するために、それぞれ少なくとも1つのT細胞エピトープを含む領域間で、標準的プロテアーゼ感受性部位を組換えにより又は合成によって工作することが出来る。例えば、KK若しくはRR等の荷電したアミノ酸の対を、ペプチドの組換え構築中にペプチ

ド内の領域間に導入することが出来る。その結果のペプチドを、カテプシン及び／又は他のトリプシン様酵素開裂に対して感受性にして1つ以上のT細胞エピトープを含むペプチドの部分を生産することが出来る。更に、かかる荷電アミノ酸残基は、ペプチドの溶解度の増大を生じさせることが出来る。

この発明のペプチド若しくは蛋白質（例えば、CryjII又はその断片）をコードするDNAの位置指定突然変異導入法を利用して、公知の方法によってこのペプチド若しくは蛋白質の構造を改変することが出来る。かかる方法は、その他の方法の中で、縮退したオリゴヌクレオチド（Ho等、Gene, 77:51-59 (1989)）を用いるか又は全合成の突然変異遺伝子（Hostomsky, Z.等、Biochem. Biophys. Res. Comm., 161:1056-1063 (1989)）を用いるPCRを含む。細菌での発現を促進するために、前述の方法を他の手順と共に用いて、この発明の蛋白質若しくはペプチドをコードするDNA構築物中の真核生物用コドン（E. coli, 酵母、哺乳動物細胞又は他の真核生物細胞中で優先的に利用されているもの）に変えることが出来る。

現在利用可能な構造的情報を用いて、杉花粉感受性の個人に十分量で投与したときにその個人の杉花粉に対するアレルギー応答を調節するCryjIIペプチドをデザインすることが出来る。これは、例えば、CryjIIの構造を調べ、杉花粉感受性の個人におけるB細胞及び／又はT細胞応答に影響を与える能力について試験すべきペプチド

を（発現系により、合成により若しくはその他の方法により）生成し及びそれら

の細胞により認識されるエピトープを含む適当なペプチドを選択することによって行なうことが出来る。杉花粉アレルゲンが杉花粉感受性の個人にアレルギー反応を誘発する能力をブロックし若しくは阻止することの出来る薬剤若しくは薬物をデザインすることも現在可能である。かかる薬剤は、例えば、それらが関連する抗CryjII IgEに結合し、それ故、IgE-アレルゲン結合及びその後のマスト細胞脱顆粒を阻止するような方法でデザインすることが出来る。或は、かかる薬剤は、免疫系の細胞性成分に結合することが出来、*Cryptomeria japonica*花粉アレルゲンに対するアレルギー応答の抑制若しくは脱感作を生じる。これの非制限的な例は、杉花粉に対するアレルギー応答を抑制する本発明のcDNA/蛋白質構造に基づく、適当なB及びT細胞エピトープペプチド又はそれらの改変物の利用である。これは、杉花粉感受性の個人からの血液成分を用いるイン・ビトロ研究においてB及びT細胞機能に影響を与えるB及びT細胞エピトープペプチドの構造を限定することにより行なうことが出来る。

本発明の蛋白質、ペプチド又は抗体を、杉花粉症を検出し及び診断するために利用することも出来る。例えば、これは、杉花粉に対する感受性を評価すべき個人から得た血液若しくは血液生成物を、単離した抗原性ペプチド若しくはCryjIIのペプチド、又は単離したCryjII蛋

白質と、血液成分（例えば、抗体、T細胞、B細胞）とペプチド若しくは蛋白質との結合に適した条件下で合わせて、かかる結合が起きる程度を測定することによって行なうことが出来る。本発明の蛋白質、ペプチド又は抗体を利用し得る他のアレルギー疾患の診断方法は、放射アレルゴソルベント試験（RAST）、ペーパー放射免疫ソルベント試験（PRIST）、酵素結合免疫ソルベントアッセイ（ELISA）、放射免疫アッセイ（RIA）、免疫-放射分析アッセイ（IRMA）、蛍光免疫アッセイ（LIA）、ヒスタミン放出アッセイ及びIgE免疫プロットを含む。

他の診断試験において、個人における少なくとも1つの蛋白質アレルゲンCryjIIに特異的なIgEの存在及びそれらの個人のT細胞のCryjII蛋白質アレルゲンのT細胞エピトープに応答する能力は、それらの個人に即時型過敏症試験及び遅



遅延型過敏症試験を施すことによって測定することが出来る。これらの個人に、CryjII蛋白質アレルゲン若しくはその一部分又はCryjII蛋白質若しくはその一部分の改変型（各々は、このアレルゲンに特異的なIgEに結合する）を用いて即時型過敏症試験（例えば、Immunology (1985) Roitt, I.M., Male, D.K. (編), C.V.Mosby Co., Gower Medical Publishing, London, NY, 19.2-19.18頁; 22.1-22.10頁を参照）を施した。これらの同じ患者に、即時型過敏症試験を施す前、施すと同時、又は施した後に、遅延型過敏症試験を施した。勿

論、即時型過敏症試験を遅延型過敏症試験の前に施す場合は、遅延型過敏症試験は特異的な即時型過敏症反応を示した個人に行なわれる。遅延型過敏症試験は、蛋白質アレルゲン若しくはその一部分の改変型又は蛋白質アレルゲンから導かれたレコンビトープペプチドを利用し、これらの各々は、ヒトT細胞刺激活性を有するが、このアレルゲンに感受性の個人集団の相当のパーセンテージ（例えば、少なくとも約75%）においてこのアレルゲンに特異的なIgEに結合しない。上記の診断試験の結果に基づいて、特異的な即時型過敏症反応及び遅延型過敏症反応の両方を有することが見出された個人は、治療上有効な量の治療用組成物を投与するための適当な候補である。この治療用組成物は、改変型の蛋白質若しくはその一部分、組換えにより生成した蛋白質アレルゲン、又はレコンビトープペプチド（各々、遅延型過敏症試験で用いられる）及び製薬上許容し得るキャリアー若しくは希釈剤を含む。

本発明は又、CryjIIのすべての若しくは少なくとも1つの断片をコードするDNAを含む発現ベクターを含む宿主細胞をCryjII若しくは少なくともその1断片の発現に適した条件下で培養することを含むCryjII若しくはその断片を生成する方法をも提供する。次いで、発現された生成物を公知技術を用いて回収する。或は、CryjII若しくはその断片を、公知の機械的若しくは化学的技術を用いて合成することが出来る。

この発明の任意の具体例において用いたDNAは、ここに記載したようにして得られたcDNAであるか、或は、ここに表示した配列の全部若しくは一部を有

する任意のオリゴデオキシヌクレオチド配列又はそれらの機能的等価物であってよい。かかるオリゴデオキシヌクレオチド配列は、公知技術を用いて、化学的若しくは酵素的に生成することが出来る。オリゴヌクレオチド配列の機能的等価物は、1) CryjIIの配列（又は対応する配列部分）又はその断片がハイブリダイズする相補的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズし得る配列、又は2) CryjIIに相補的な配列（又は対応する配列部分）及び／又は3) CryjIIの配列（又は対応する配列部分）によりコードされる生成物と同じ機能的特性を有する生成物（例えば、ポリペプチド又はペプチド）をコードする配列であるものである。機能的等価物が一方の基準を満たさなければならないか両方の基準を満たさなければならないかは、その利用に依る（例えば、もしそれがオリゴプローブとしてののみ用いられるならば、それは第1若しくは第2の基準を満たささえすれば良く、もしそれがCryjIIアレルゲンを生成するために用いられるならば、第3の基準さえ満たせば良い）。

この発明を、更に、下記の非制限的実施例により説明する。

#### 実施例1

##### 杉花粉アレルゲン（CryjII）の精製

以下の杉花粉からの天然アレルゲンCryjIIの精製は、以前に刊行された報告（Yasueda等、J.Allergy Clin.Immunol.71:77, 1983; Sukaguchi等、Allergy, 45:309 (1990)）を改変したものである。

日本国から得た100gの杉花粉（ワシントン、Spokane在、HollisterStir）を1Lのジエチルエーテル中で3回脱脂し、濾過後に花粉を集めてエーテルを真空中で乾燥させた。

脱脂した花粉を、50mM トリスHCl（pH7.8）、0.2M NaCl及びプロテアーゼ阻害剤（2μg/ml（終濃度）大豆トリプシン阻害剤、1μg/ml（終濃度）ロイペプチン、1μg/ml（終濃度）ペプスタチン及び0.17mg/ml（終濃度）フェニルメチルスルホニルフルオリド）を含む2Lの抽出用緩衝液中で4℃で一晩抽出した。不溶性物質を1.2Lの抽出用緩衝液で4℃で一晩再抽出し、両抽出物を合わせて、抽出用緩衝液で平衡化したWhat

man DE-52セルロース（乾重量200g）を用いてパッチ式吸収により色素脱失した。

色素脱失した物質を、次いで、80%飽和（4℃）の硫酸沈澱により分画して、低分子量の物質の多くを除去した。その結果のペレットを、0.4Lのプロテアーゼ阻害剤を含む50mM 酢酸ナトリウム（pH5.0）に再懸濁させ、同緩衝液に対して十分に透析した。

この試料を、更に、下記の2つの方法の何れか1つによる精製にかけた。

#### 方法A

この試料を、4℃でプロテアーゼ阻害剤を加えた50mM 酢酸ナトリウム（pH5.0）で平衡化した100mLのDEAEセルロースカラム（Whatman DE-52）に加えた。DEAEセルロースカラムからの未結合物質（塩基性蛋白質）を、次いで、プロテアーゼ阻害剤を加えた4℃の10mM 酢酸ナトリウム（pH5.0）で平衡化した50mlのカチオン交換カラム（Whatman CM-52）に加えた。0-0.3M NaClの直線的勾配を用いてこれらの蛋白質を溶出させた。初期画分はCryjIに富み、他方後期画分はCryjIIに富んでいた。CryjIIを含む画分をプールし、次いで、10mM酢酸ナトリウム（pH5.0）にて1mLのMono S HR5/5カラム（ニュージャージー、Pischatway在、Pharmacia）に加えて蛋白質を室温でNaClの直線的勾配を用いて溶出させた。残留CryjIIは0.2M NaClで溶出し、CryjIIは0.3~0.4M NaClで溶出した。CryjIIのピークをプールし、凍結乾燥により2倍に濃縮してゲル濾過クロマトグラフィーにかけた。

この試料を、10mM 酢酸緩衝液（pH5.0）及び0.15M NaClにて、FPLC Superdex 7516/60カラム（ニュージャージー、Piscataway在、Pharmacia）に、室温で、30ml/分の流量で加えた。精製CryjIIを35~30kD領域で回収した。CryjIIは、SDS-PAGE（銀染色）で分析した際に、非還元条件下で、2つのブロードなバンドとしてCryjIより低く移動した（図1a）が、還元条件下では、両バンドとも上方へシフトしてCryjIと

して移動した(図1b)。この高度に精製したCryjIIは、CryjIに結合することが示されたMAb CBF2を用いるウエスタンブロット及びN末端蛋白質配列決定により検出したように、依然として少量(～5%)のCryjIを含んだ。このCryjI調製物を用いて、後述のように、CryjIIの一次蛋白質配列を生成させた。

#### 方法B

硫酸沈澱から透析した試料を、プロテアーゼ阻害剤を含む50mM 酢酸ナトリウム(pH5.0)で4℃で平衡化した5.0mlのQ-Sepharose Econopacアニオン交換カートリッジ(カフオル7、Richmond在、BioRad)に1ml/分で加えた。溶出を、0.5M NaClを含む上記の緩衝液を用いて行なった。次いで、塩基性の未結合物質を、プロテアーゼ阻害剤を含む50mM 酢酸ナトリウム(pH5.0)で平衡化した5.0mlのCM-Sepharose Econopacカチオン交換カートリッジ(カフオル7、Richmond在、BioRad)に加えた。塩基性蛋白質を、0.1M リン酸ナトリウム(pH7.0)、0.3M NaClまでの直線的勾配を用いて4℃で1ml/分にて溶出した。CryjIIに富むピークを勾配の

後期にて集めて更にゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。

FPLCゲル濾過を、320mLのSuperdex 7526/60(ニュージャージー、Piscataway在、Pharmacia)カラムを用いて、0.15M NaClの存在下で20mM酢酸ナトリウム(pH5.0)にて、0.5ml/分で行なった。CryjIIを殆ど含む主要ピークは、160～190mlにて溶出した。次に、夾雑CryjIを、10mlM 酢酸ナトリウム(pH5.0)で平衡化した1.0ml Mono S 5/5(ニュージャージー、Piscataway在、Pharmacia)カチオン交換カラムを用いるFPLCにより除去した。0～1M NaClの段階的勾配を、0.2M、0.3M、0.4M及び1M塩濃度をイソクラティックに維持することにより利用した。

複数のピーク(最大9ピーク)を得て(図2)、還元条件下のSDS-PAGE(銀染色)により分析した(図3)。報告されたpI8.6～8.9(Yasueda等、J. Allergy Clin. Immunol., 17巻(1983))を有するCryjIは、初期のピークに溶出し、約40kDの分子量を示した。CryjIIは、2本のバンドとして均質にまで精製され(図3)、後期の複数のピークに溶出されたが、これは、イソ

型の存在を示唆している。生化学的に精製したCryjIに対して高められたマウスモノクローナル抗体8B11 IgGを用いるELISA分析は、これらの精製CryjI調製物中にCryjIの存在しないことを確実にし

た。この精製CryjIIをヒトIgE反応性の研究（実施例6）において用いた。

#### CryjIIの物理的特性

CryjIIの物理的特性を下記のように研究し、要約した。非還元的SDS-PAGE条件下では、CryjIIは、34000～32000に及ぶ分子量の2本のバンドからなる。両バンドの分子量は、還元条件下では、約38～36kDまで高分子量側へシフトする（図1b）。このSDS-ポリアクリルアミドゲル中でのシフトも他者（Sakaguchi等、Allergy 45:309-312（1990））により観察された。これらの結果は、恐らく分子内ジスルフィド結合がこの蛋白質内に存在することを示唆し、それは、クローン化CryjIIがヌクレオチド配列から演繹される20個のシステインを含むという現在の発見（実施例3）が支持している。IEFゲルから評価したCryjIIのpIは約10である。この精製CryjIIは、何人かの患者のヒトIgEと結合する。

これらのCryjIIの2つの分子量のバンドを、12%SDS-ポリアクリルアミドゲル上で分離し、次いで、PVD F膜（カリフォルニア、Foster City在、Applied Biosystems）上にエレクトロブロットした。そのブロットを、クーマシーブリリアントブルーで染色し、切り取ってN末端アミノ酸配列決定にかけた（実施例2）。それらの結果は、低分子量のバンドが最初の5アミノ酸を失っていることを除いては、これらの分子量の大きいバ

ンド及び小さいバンドが同じN末端配列を有することを示した。cDNAの配列に基いて評価した大きい方のバンドの分子量は約52,000であり、これは、還元剤の存在及び不在においてSDS-ポリアクリルアミドゲルで評価した分子量より有意に大きい。それは又、ゲル濾過及び予備的質量分析から得られたものよりも大きい。この違いを説明する幾つかの可能性がある。1つの可能性は、CryjII蛋白質がプロセッシングを受けるということである。この蛋白質のN末端及

びC末端が開裂されるということはあり得ることである。このプロセッシングが細胞中で起こるのか或は、4種の異なるプロテアーゼ阻害剤を殆どの精製工程で加えたにもかかわらず精製工程の間の蛋白質加水分解によるものであるのかは現時点では不明である。それにもかかわらず、精製CryjIIから得られた2つのN末端配列（実施例2）は又、Sakaguchi等（Allergy, 45:309-312（1990））により公表されたN末端配列（10アミノ酸）を含み、これは、恐らくCryjIIのN末端が加水分解されていることを示唆している。Sakaguchi等（前出）は彼らの精製において何らプロテアーゼ阻害剤を用いなかったため、高度の加水分解が起きたのであろう。これは、Sakaguchi等が得たN末端アミノ酸配列が何故に実施例2で論じるN末端配列の下流であったのかを説明することが出来よう。

天然CryjII又は組換えCryjIIを精製するために用い得る他のアプローチは、イムノアフィニティークロマトグ

ラフィーである。この技術は、モノクローナル抗体と抗原との間の相互作用の特異性による非常に選択的な蛋白質の精製を提供する。マウスポリクローナル及びモノクローナル抗体を、精製したCryjIIに対して生成させる。これらの抗体を、アレルゲンCryjIIの精製、特性決定、分析及び診断に用いる。

## 実施例 2

### 精製CryjIIの蛋白質配列決定

CryjII蛋白質を実施例1におけるようにして単離した。SDS-PAGEで示した二重バンド（図1a）をProBlott（カリフォルニア、Foster City在、Applied Biosystems）上へエレクトロブロットした。配列決定をBeckman/Porton Microsequencer（モデルLF3000、カリフォルニア、Carlsbad在、Beckman Instruments）、プログラムブル溶剤モジュール（カリフォルニア、Carlsbad在、Beckman Instruments, System Gold Model 126）及びPTH-アミノ酸検出用ダイオードアレイデテクターモジュール（カリフォルニア、Carlsbad在、Beckman Instruments, Beckman System Gold Model 168）を製造者のマニュアルに従って用いて行なった。

上方の二重バンドの単一のN末端配列分析及び下方の二重バンドの複数のN末端配列分析は、両バンドが「ロング」及び「ショート」と呼ばれる2つのN末端

を含むことを示した。下方の二重バンドは、約 3.3 ピコモルのロング型と 8.3 ピコモルのショート型を含んだ。こ

の収量の差異は、各シーケンサーサイクルにおける計量による配列割り当てをずらすのに十分であった。上方の二重バンドは、約 8.3 ピコモルの両配列を含んだ。現われたロング配列は、NH<sub>2</sub>-RKVEHSRHDAINIFNVEKYGAVGDGKH-DCTEAFSTAW (Q) ( ) ( ) ( ) KNP ( )-COOH (配列番号：4) (ここに、(Q) は、38 位のグルタミンの仮の同定を示し、( ) は、39~41 及び 45 位の未知の残基を示す) であった。現われた「ショート」配列は、NH<sub>2</sub>-SRHDAINIFNVEKYGAVDGHKHDCTEAFSTAWS-COOH (配列番号：5) であった。従って、ロングCryjII配列は、ショート型よりも 5 つの更なるアミノ末端残基を有し、ショート型の配列は、ロング型のそれと正確に一致した。更に、CryjIIのロング及びショート両型は、以前にCryjIIについて記載された (Sakaguchi等、1990、前出) 10 アミノ酸 NH<sub>2</sub>-A I N I F N V E K Y-COOH (配列番号：6) を含んだ。以前に公表された 10 アミノ酸 (Sakaguchi等、1990、前出) は上記のロング型のアミノ酸 10~19 に対応する。

### 実施例 3

#### 杉花粉及び雄蕊を有する球果からの RNA の抽出及びCryjIIのクローニング

Arnold Arboretum (マサチューセツ、Boston) にある 1 本の *Cryptomeria japonica* (杉) の木から採集した新鮮な花

粉及び雄蕊を有する球果試料を直ちにドライアイス上で凍結した。RNA を 500 mg の各試料から、本質的に Frankis 及び Mascarenhas、(1980) Ann. Bot. 45:595-599 により記載された様にして調製した。これらの試料をドライアイス上で乳鉢と乳棒ですり潰し、0.1% ジエチルピロカーボネート (DEPC) で一晩処理した 0.2 M NaCl、1 ml EDTA、1% SDS を有する 5 ml の 50 mM トリス (pH 9.0) に懸濁させた。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1 で混合) で 5 回抽出した後に、RNA を

水相から、0.1容の3M 酢酸ナトリウム及び2容のエタノールで沈殿させた。遠心分離によりペレットを回収し、2mlのd H<sub>2</sub>Oに再懸濁させ、65℃に5分間加熱した。2mlの4M 塩化リチウムを沈殿に加えて、RNAを-80℃でインキュベートした。遠心分離によりRNAペレットを回収し、1mlのd H<sub>2</sub>Oに再懸濁させ、再び3M 酢酸ナトリウム及びエタノールでドライアイス上で1時間沈殿させた。最後のペレットを70%エタノールで洗い、空気乾燥させ、100μlのDEPC処理したd H<sub>2</sub>Oに再懸濁させて-80℃に貯蔵した。

二本鎖cDNAを、4μg（花粉）及び8μg（頭状花序）のRNAから、市販のキット（cDNA合成システムキット、刈-ランド、Gaithersburg在、BRL）を用いて合成した。二本鎖cDNAをフェノール抽出及びエタノール沈殿し、Rafnar等（1991）J.Biol.Chem.266:1229-1236;Frohman等（1990）Proc.Natl.Acad.Sci.USA85:8998-9002;及びRoux等（1990）BioTech.8:48-57の方法に従って、改変アンカーPCR反応で用いるために、T4DNAポリメラーゼ（ウイコソシ、Madison在、Promega）で鈍端化し、次いで、エタノール沈殿して自己アニールしたAT及びALオリゴヌクレオチドに繋いだ。オリゴヌクレオチドATは、配列（配列番号：10）5'-GGGTCTAGAGGTACCGTCCGTCGATCATT-3'（Rafnar等、前出）を有する。オリゴヌクレオチドALは、配列（配列番号：11）5'-AATGATCGATGCT-3'（Rafnar等、前出）を有する。

CryjIIのアミノ末端をリンカー結合したcDNA（20μl反応の2μl）からの増幅における最初の試みは、縮退したオリゴヌクレオチドCP-11及びオリゴヌクレオチドAPを用いて行なった。CP-11は配列（配列番号：12）5'-ATACTTCTCTIACGTTGAA-3'を有し、ここに、1位のAはGであってもよく、4位のCはTでもよく、7位のCはTでもよく、10位のIは縮退を減らすためのイノシンであり（Knoth等（1988）Nucleic AcidsRes. 16:10932）、13位のGはAでもよく、そして16位のGはAでもよい。配列（配列番号：13）5'-GGGTCTAGAGGTACCGTCCG-3'を有するAPは、オリゴヌクレオチドATのヌクレオチド1～20に対応する。



CP-11は、実質的にアミノ酸配列PheAsnValGluLysTyr（配列番号：14）（図4のアミノ酸59～64）をコードするコード鎖配列に相補的な縮退オリゴヌクレオチド配列であり、これらは、図4に示した以前に公表されたCryjII配列（Sakaguchi等、前出）のカルボキシ末端に対応する。すべてのオリゴヌクレオチドは、アラバマ州、Huntsville在、Research Genetics Inc.により合成された。

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を、市販のキット（GeneAmp DNA増幅キット、コネチカット、Norwalk在、Perkin Elmer Cetus）を用いて行ない、dNTPを含む10 $\mu$ lの10 $\times$ 緩衝液を100 pモルの各オリゴヌクレオチド、cDNA（20 $\mu$ lの第1鎖cDNA反応混合物の3～5 $\mu$ l）、0.5 $\mu$ lのAmplitaqDNAポリメラーゼ及び蒸留水（100 $\mu$ lにする）と混合した。

これらの試料を、プログラム可能な温度制御装置（マサチューセツ、Cambridge在、MJ Research, Inc.）を用いて増幅した。増幅の最初の5回は、94 $^{\circ}$ Cで1分間の変性、45 $^{\circ}$ Cで1分間のプライマーのテンプレートへのアニーリング及び72 $^{\circ}$ Cで1分間の鎖延長からなつた。増幅の最後の20回は、上記のとおりの変性、55 $^{\circ}$ Cで1分間のアニーリング及び上記の通りの鎖延長からなつた。第一次PCR反応を100 pモルの各オリゴヌクレオチドAP及びCP-11を用いて行なつた。次いで、この初期増幅の5パーセント（5 $\mu$ l）を、各100 p

モルAP及びのCP-12を用いる第二次増幅で用いた。CP-12は、配列（配列番号：15）5'-CCTGCAGTACTTCTCIACGTGAAIAT-3'を有し、ここで10位のCはTでもよく、13位のCはTでもよく、16及び25位のIは上記の種苦諦を減じるためのイノシンであり、19位のGはAでもよく、22位のGはAでもよい。配列（配列番号：16）5'-CCTGCAG-3'（CP-12の塩基1～7）は、クローニング目的のために加えられたPstI部位を表す。残りの縮退したオリゴヌクレオチド配列は、CryjIのアミノ酸IlePheAsnValGluLysTyr（配列番号17）（図4のアミノ酸58～64）を実質的にコードするコード鎖に相補的である。増幅したDNAを、逐次的なクロロホルム、フェノール及びクロロホルム抽出と、その後の0.5容の7.5M酢酸アンモニウム及び

1. 5容のイソプロパノールでのドライアイス上での沈澱によって回収した。沈澱及び70%エタノールでの洗浄の後に、このDNAを、50  $\mu$ lの反応にてXbaIとPstIで同時に消化し、沈澱させて容積を10  $\mu$ lに減らして調製用2%GTG NuSieve低融点ゲル(Inv. Rockport在、FMC)中で電気泳動した。適当な寸法のDNA領域を、エチジウムブロミド(EtBr)染色により可視化し、取り出して、市販の配列決定用キット(Sequenase kit, オハイオ、Cleveland在、U.S.Biochemicals)を用いて、ジデオキシチェーントーミネーション法(Sanger等(1977) Proc.Natl.Acad.Sci.USA74:54463-5476)により配列決定するために、適当に消化したpUC19中に繋いだ。すべての生成したクローンを配列決定したが、CryjII配列を含むものは見出されなかった。代わりの2°PCR反応をAP及びネストしたオリゴヌクレオチドCP-21を用いて行なった。CP-21は、配列(配列番号:18) 5'-CCTGCAGTACTTCTCTCTACGTTGAAGAT-3'を有し、ここに、10位のCはTでもよく、13位のCはTでもよく、16位のIは上記の縮退を減らすためのイノシンであり、19位のGはAでもよく、22位のGはAでもよく、そして25位のGはA又はTでもよい。配列(配列番号:16) 5'-CCTGCAG-3' CP-21の塩基1~7)は、クローニング目的のために加えられたPstI部位を表し; 残りの縮退したオリゴヌクレオチド配列は、実質的にアミノ酸IlePheAsnValGluLysTyr(配列番号:17)(図4のアミノ酸58~64)をコードするコード鎖配列に対応する非コード鎖配列である。

第一次PCRを、上記のように、二本鎖のリンカー結合したcDNAにおいて、CP-23D及びAPを用いても行なって、CryjIIcDNAの3'末端を増幅することを試みた。第二次PCRを、第一次反応の5%を用いて、CP-24D及びAPを用いて行なった。CP-23D[配列(配列番号:19) 5'-GCCTATTAATATTTTAA-3'(ここに、6位のTはC又

はAでもよく、9位のTはCでもよく、12位のTはC又はAでもよく、そして

15位のTはCでもよい) ] は、実質的にアミノ酸配列AlaIleAsnIlePheAsn (配列番号: 20) (図4のアミノ酸55~60) をコードするコード鎖配列であり; CP-24D (配列番号: 21) [配列5'-GGAATTCCGCIATTAATATTTTAAATGT-3' (ここに、14位のTはC又はAでもよく、17位のTはCでもよく、20位のTはC又はAでもよく、23位のTはCでもよく、そして26位のTはCでもよい) ] は、配列5'-GGAATTCC-3' (配列番号: 22) (CP-24の塩基1~8) を含み、これは、クローニング目的のために加えられたEcoRI部位を表す。CP-24Dの残りの縮退オリゴヌクレオチド配列は、実質的にアミノ酸AlaIleAsnIlePheAsnVal (配列番号: 23) (図4のアミノ酸55~61) をコードする。再び、複数クローンを配列決定したが、CryjIIと同定されたものはなく、このアプローチは、これ以上追求しなかった。

実施例2に記載した新規なCryjII蛋白質配列データの特徴表示に基いて、CryjIIをクローニングするための新規な縮退オリゴヌクレオチドをデザインして合成した。以後言及するすべてのオリゴヌクレオチドは、ABI 394DNA/RNA Synthesizer (カリフォルニア州、Foster City在、Applied Biosystems) にて合成し、NAP-10カラム (スウ

エーデン国、Uppsala在、Pharmacia) にて、製造者の支持に従って精製した。縮退オリゴヌクレオチドCP-35をAPと共に二本鎖のリンカー結合したcDNAにおいて、上記のように行なう第一次PCR反応において用いた。CP-35は、配列 (配列番号: 24) 5'-GCTTCGGTACAATCATGTTT-3' [ここに、3位のTはCでもよく、6位のGはA、T又はCでもよく、9位のAはGでもよく、12位のAはGでもよく、15位のAはGでもよく、そして18位のTはCでもよく、この縮退オリゴヌクレオチド配列は、実質的にアミノ酸配列CryjIIのLysHisAspCysThrGluAla (配列番号: 25) (図4のアミノ酸71~77) をコードするコード鎖配列に対応する非コード鎖配列である] を有する。次いで、この初期増幅の5パーセント (5 $\mu$ l) (JC136と呼ぶ) を、AP及び縮退CryjIIプライマーCP-36 [配列 (配列

番号：26) 5' -GGCTGCAGGTACAATCATGTTTGCCAT  
C-3' (ここに、11位のAはGでもよく、14位のAはGでもよく、17位  
のAはGでもよく、20位のTはCでもよく、23位のGはA、T又はCでもよ  
く、26位のAはGでもよい) を有する初期にネストしたCryjIIオリゴヌクレオ  
チドプライマー] の各々100 pモルと共に第二次増幅において用いた。ヌクレ  
オチド5' -GGCTGCAG-3' (配列番号：27) (CP-36の塩基1  
～8) は、クロー

ニング目的のために加えられたPst I制限部位を表している。CP-36の残  
りの縮退オリゴヌクレオチド配列は、実質的にCryjIIのアミノ酸AspGlyL  
ysHisAspCysThr (配列番号：28) (図4のアミノ酸69～75  
) をコードするコード鎖配列に対応する非コード鎖配列である。優勢な増幅生成  
物(JC137と呼ぶ) は、EtBr染色2%GTGアガロースゲルで可視化し  
たところ、約265塩基対のDNAバンドであった。

増幅したDNAを、逐次的なクロロホルム、フェノール及びクロロホルム抽出  
と、その後の0.5容の7.5酢酸アンモニウム及び1.5容のイソプロパノール  
での-20℃での沈澱によって回収した。沈澱及び70%エタノールでの洗浄  
の後に、このDNAを、15μlの反応にてXba IとPst Iで同時に消化し  
て調製用2%GTG SeaPlaque低融点ゲル(マイン、Rockport在、FMC) 中で  
電気泳動した。適当な寸法のDNAバンドを、EtBr染色により可視化し、取  
り出して、市販の配列決定用キット(Sequenase kit, マイ、Cleveland在、U.S.  
Biochemicals) を用いて、ジデオキシチェーンターミネーション法(Sanger等  
(1977) Proc.Natl.Acad.Sci.USA74:54463-5476) により配列決定するために、適  
当に消化したpUC19中に繋いだ。

pUC19JC137a、pUC19JC137b及びpUC19JC137  
eと呼ばれるクローンは、Cryj  
IIのアミノ末端をコードする配列を含むことが見出された。3クローンは、すべ  
て、5' 非翻訳領域において異なる長さを有するにもかかわらず、それらの重複

領域において同一の配列を有した。クローンpUC19JC137bは、最長のクローンであった。これらのクローンの翻訳された配列は、開示されたCryjIIの10アミノ酸配列（Sakaguchi等、前出）並びに実施例2に記載したCryjIIアミノ酸配列と完全な同一性を有した。アミノ酸の番号付けは、完全長の蛋白質の配列に基いており、アミノ酸1はCryjIIの間始メチオニン（Met）に対応する。間始Metの位置は、上流のインフレームの停止コドンの存在により及び周囲ヌクレオチド配列の植物のコンセンサス配列との78%相同性により支持された（該コンセンサス配列は、Lutcke等（1987）EMBOJ. 6:43-48により報告されたように、間始Metを含む）。

CryjII遺伝子の残りをコードするcDNAを、リンカー結合したcDNAから、オリゴヌクレオチドCP-37（配列番号：29）（これは、配列5'-ATGTTGGACAGTGTGTCGAA-3'を有する）及びAPを第一次PCRにおいて用いることによってクローン化し、JC138iiと呼んだ。オリゴヌクレオチドCP-37は、図4のヌクレオチド129～149に対応し、部分的CryjIIクローンpUC19JC137bについて決定されたヌクレオチド配列に基づいている。

第2のPCR反応を、各100pモルのAP及びCP-38（配列番号：30）（これは、配列5'-GGGAATTCAGAAAAGTTGAGCATTCTCGT-3'を有する）、ネストしたプライマーを用いて、初期増幅混合物の5%にて行なった。ヌクレオチド配列（配列番号：31）5'-GGGAATTC-3'（CP-38の塩基1～8）は、クローニング目的のために加えられたEcoRI制限部位を表す。残りのオリゴヌクレオチド配列は、図4のヌクレオチド177～197に対応し、部分的CryjIIクローンpUC19JC137bについて決定されたヌクレオチド配列に基づいている。増幅したDNA生成物（JC140iiiと呼ぶ）を上記のように精製して沈殿させ、その後EcoRI及びAsp718で消化して調製用の1%低融点ゲル中で電気泳動した。約1.55kb長の優勢なDNAバンドを切り出し、配列決定のためにpUC19中にライゲートした。DNAを、市販のキット（sequenase kit

(カバ、Cleveland在、U.S.Biochemicals)を用いて、ジデオキシチェンターミネーション法(Sanger等、前出)により配列決定した。両鎖を、M13順方向及び逆方向プライマー(マチューセツ、Beverly在、N.E.Biolabs)及び内部シーケンシング用プライマーCP-35、CP-38、CP-40、CP-41、CP-42、CP-43、CP-44、CP-45、CP-46、CP-47、CP-48、CP-49、CP-50及びCP-51を用いて、完全に配列決定した。CP-40(配列番号:32)は、配列5'-GTTCTTCAATGGCCATGT-3'を有し、図4のヌクレオチド359~377に対応する。CP-41(配列番号:33)は、配列5'-GTGTTAGGACTGTCTCTCGG-3'を有し、それは、図4のヌクレオチド720~739に対応する非コード鎖配列である。CP-42(配列番号:35)は、配列5'-TGTCAGGCCATGGAATAAG-3'を有し、それは、図4のヌクレオチド864~883に対応する(但し、最初のヌクレオチドは、正しいGではなくてTとして合成)。CP-43は、配列(配列番号コロ35)5'-GCCTTACATGGACTGCAACC-3'を有し、それは、図4のヌクレオチド1476~1495に対応する非コード鎖配列である。CP-44は、配列(配列番号:36)5'-TCCACGGGTCTGATAATCCA-3'を有し、それは、図4のヌクレオチド612~631に対応する。CP-45は配列(配列番号:37)5'-AGGCAGGAAGCAATTTTCCC-3'を有し、それは、図4のヌクレオチド1254~1273に対応する非コード鎖配列である。CP-46は、配列(配列番号:38)5'-TACTGCACTTCAGCTTCTGC-3'を有し、それは、図4のヌクレオチド1077~1096に対応する。CP-47は、配列(配列番号:39)GGGGGTCTCCGAATTTATCA-3'を有し、それは、図4のヌクレオチド1039~1058に実質的に対応する非コード鎖である(但し、CP-47の第5ヌクレオチドは、正しいヌクレオチドTではなくGとして合成)。CP-48(配列番号:40)は、配列5'-GGATATTTCACTGGACACGT-3'を有し、図4のヌクレオチド1290~1309に対応する。CP-49(配列番号:41)は、配列5'-TATTAGAAGACCCGTGCCT-3'を有し、それは、図4のヌクレオチド821~840に対応する非コード鎖配列である。CP-50(配列番号:42)は、配列5'-CCATGTAAGGCCAAGTTAGT-3'を有し、それは、図4のヌクレオチド1485~1504に対応する。

。CP-51（配列番号：43）は、配列5'-ACACCTTTACCCATTAGAGT-3'、それは、図4のヌクレオチド486～505に対応する非コード鎖である。

3つのクローン（pUC19JC140iia、pUC19JC140iid及びpUC19JC140iieと呼ぶ）は、実質的に部分的なCryjII配列を含むことが見出された。クローンpUC19JC140iidの配列を、それが最長の3'非翻訳領域を有するので、コンセンサス配列として選択した。

pUC

19JC140iid及びpUC19JC137bの配列を用いて、図4に示した複合CryjII配列を構築した。この複合体において、ヌクレオチド230は、pUC19JC137b中に（pUC19JC137a、pUC19JC140iia及びpUC19JC140iieにおいても）見出されるAとして報告されており、pUC19JC140iid中にGとして見出されるものではない。しかしながら、ヌクレオチド230のA及びGの両者は、アミノ酸63のLysをコードしている。クローンpUC19JC140iia配列はpUC19JC140iidのそれと同一であったが、次の点は除く：pUC19JC140iiaは、ヌクレオチド357にCの代りにTを有し（アミノ酸106に予想される変化はない）、ヌクレオチド754にTではなくCを有し（アミノ酸238のIleからThrへの変化）、ヌクレオチド1246にTではなくCを有し（アミノ酸402のLeuからProへの変化）、そしてヌクレオチド1672にCではなくTを有する（非翻訳領域）。クローンpUC19JC140iieの配列は、pUC19JC140iidのそれと同一であったが、但し、ヌクレオチド794はAではなくGであり（アミノ酸251のIleからMetへの変化）、そしてヌクレオチド357はCの代りにTであった（アミノ酸106に予想される変化はない）。

EcoRI/XbaI消化（オリゴヌクレオチドAP

は、XbaI及びAsp718制限酵素部位の両者を有する）を用いるJC140iiiPCR生成物のクローニングにおける初期の試みは、CryjIIcDNA中の

内部XbaI制限部位のために半分に切断されたcDNAを生成して、800及び750bpバンドを生じ、750bpのバンドは上首尾にEcoRI/XbaI消化したpUC19中にクローン化され、配列決定された。2つの750bpクローンを配列決定してCryjII分子の5' 半分であることを見出した(クローンpUC19JC140-2a及びpUC19JC140-2b)。クローンpUC19JC140-2aは、ヌクレオチド297にTの代りにCを有し(アミノ酸86のCysからArgへの変化)及びクローンpUC19JC140-2bはヌクレオチド753にAではなくGを有する(アミノ酸238のIleからValへの変化)。両クローンpUC19JC140-2a及びクローンpUC19JC140-2bはヌクレオチド357にCの代りにTを有する(アミノ酸106に予想される変化はない)。

2つの異なるPCR増幅は又、クローン化CryjII配列をAmplitaq Cycle Sequencing kit (コネカット、Norwalk在、Perkin Elmer Cetus)を用いて、直接、配列決定して確認した。この手順は、オリゴヌクレオチド配列決定用プライマーの[<sup>32</sup>P]末端標識を含み、それは、次いで、テンプレートDNAにアニールされ(1μl中の1.6pモル)及びジデオキシNTPを用いて、4μl

10XCycling Mix (0.5U/μl Amplitaq DNAポリメラーゼを含有)、5μl テンプレートDNA (10~100fモル) 及び20μlにするだけのdH<sub>2</sub>Oをも含むPCR反応において延長される(Sanger等(1977) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463-5476)。このキットにおける停止用混合液中のdGTPは、7-デアザ-dGTPで置き換えた(DNAの高G+C領域を含む配列の増大した解像を与える)。テンプレートDNAは、PCR生成物であり、それは、順次、クロロホルム、フェノール及びクロロホルム抽出し、0.5容の7.5酢酸アンモニウム及び1.5容のイソプロパノールで-20℃で沈殿させることにより回収し、次いで、調製用の1又は2%のSeaPlaque低融点ゲル(FMC)中を電気泳動したものであった。適当な寸法のDNAバンドをEtBr染色により可視化し、切り出してGelase (ウイコンシ、Madison在、Epicentre Technologies)で処理してアガロースを除去した。このDNAを再沈殿させ、20μg/mlの



RNアーセ（インジ774、Indianapolis在、Boehringer Mannheim）を含む50  $\mu$  l  
 のTE（10mM トリス（pH7.4）、1mM EDTA（pH8.0））  
 に再懸濁させた。CryjIIをクローン化するのに用いた2つの第二次増幅を繰り返  
 し、そしてPCRサイクル配列決定用のテンプレートとして用いた：JC13  
 7 ii、5'末端PCR（上記の1°PCR JC136から増幅）をオリゴヌク  
 レオ

チドAP及びCP-36を用いて再増幅し；JC140 ii、3'末端PCR（  
 上記の1°PCR JC138 iiから増幅）をオリゴヌクレオチドAP及びCP  
 -38を用いて再増幅した。用いた1°増幅の両者を沈殿させ、1又は2%の調  
 製用SeaPlaque低融点ゲル（FMC）を通して電気泳動し、適当な寸法のバンド  
 をEtBr染色により可視化して切り出した。次いで、各1°増幅の2  $\mu$  lを対  
 応する2°PCR反応において用いた。次いで、2°PCR生成物を、PCRサ  
 イクル配列決定用のDNAテンプレートとして調製した。PCRサイクル配列決  
 定におけるプライマーとして用いたオリゴヌクレオチド（その多くは、これらの  
 クローンを配列決定するのに用いた）は、JC137 iiについて次の通りであ  
 る：CP-36及びCP-39（配列番号：44）（これは、配列5'-CTGTCCAAC  
 ATAATTGGGC-3'及び図4のヌクレオチド120～139に対応する非コード鎖配  
 列である）。JC140 iiを配列決定するのに用いたオリゴヌクレオチドプ  
 ライマーは、CP-38、CP-40、CP-41、CP-42、CP-43、C  
 P-44、CP-45、CP-46、CP-47、CP-49、CP-50、C  
 P-54（配列番号：45）（これは、配列5'-CATGGCAGGGTGGTTCAGGC-3'を有し  
 、図4のヌクレオチド985～1004に対応する）、CP-55（配列番号：  
 46）（これは、配列5'-TAGCCCCATTACGTGCACG-3'を有し、図4のヌクレオチド  
 929～94

8に対応する非コード鎖配列である）及びCP-56（配列番号：47）（これ  
 は、配列5'-TTGGGGTCGAGGCCTCCGAA-3'を有し、図4のヌクレオチド1437～1  
 456に対応する）であった。この全長PCRサイクル配列決定の配列は、図4

に示した複合pUC19JCC137b/pUC19JC140iiidCryjII配列と2ヌクレオチドだけ変化していた（これらの何れもアミノ酸変化へと導かない）。ヌクレオチド357にはCの代りにT（アミノ酸106に予想される変化はない）があり、ヌクレオチド635にはAの代りにCがあった（アミノ酸変化なし）。

CryjIIのヌクレオチド及びアミノ酸配列を図4及び5に示す。これは、2つの重複するクローンpUC19JC137b及びpUC19JC140iiidからの複合ヌクレオチド配列である。複数の独立のクローンの配列決定及びPCR生成物のサイクル配列決定は、図4のヌクレオチド配列を確実にした。上記のように、予想されるアミノ酸変化を生じる幾つかのヌクレオチド変化があった。しかしながら、すべてのヌクレオチドの多形（ヌクレオチド357におけるTによるCの置換を除く）は、単一クローン又は配列決定において認められただけであった。Tが、pUC19JC140iiidを除くすべてのクローンでヌクレオチド357において見られたにもかかわらず、C及びTの両者はアミノ酸106においてLeuをコードしている。

CryjIIに対する完全なcDNA配列は、5' 非翻訳配列の41ヌクレオチド、開始Metに対するコドン（図4のヌクレオチド42～44）で始まる1542ヌクレオチドのオープンリーディングフレーム、及び143bpの3' 非翻訳領域を含む1726ヌクレオチドからなる。コンセンサスポリアデニル化シグナル配列が、ポリAテールの64ヌクレオチド5'側の3' 非翻訳領域にある（図4のヌクレオチド1654～1659）。開始Metの位置は、インフレームの上流の停止コドンの存在により及び開始Metを含む植物のコンセンサス配列との78%の相同性により確認される（該開始Metは、CryjII中に見出されるTAAAUAGGC（図4の塩基38～46（配列番号：48））で、これは、植物についてのコンセンサス配列AACAAUAGGC（配列番号：49）Lutcke等（1987）EMBO J. 6:43-48に匹敵する）。このオープンリーディングフレームは、CryjIIについての公表された部分的蛋白質配列（Sakaguchi等、前出）（図4のアミノ酸55～64に対応）との完全な配列同一性を有する演繹された514アミノ酸の蛋白質をコ

ードする。予想されるCryjII蛋白質は、20個のCysを有し、コンセンサス配列N-X-S/Tに対応する4つの潜在的N結合グリコシレーション部位を含み、予想分子量56.6kDa及び予想pI9.08を有する。

CryjIIについての3つの別々のNH<sub>2</sub>末端配列（実施例2で測定したロング型及びショート型及び、図6に示

すように、Sakaguchi等、前出により測定されたNH<sub>2</sub>末端）の検出は、成熟CryjII蛋白質のアミノ末端がブロックされていること及び精製蛋白質の配列分析により得られた配列が蛋白質加水分解開裂生成物を表すということを示唆する。図6に示すように、CryjIIのロング型のアミノ酸配列は、アミノ酸46で始まり、CryjIIのショート型のアミノ酸配列は、アミノ酸51で始まり、そして、Sakaguchi等により測定されたNH<sub>2</sub>末端配列は、アミノ酸54で始まる。アミノ酸1～45が、酵素的に開裂されて図4のアミノ酸46で始まる機能的に活性な蛋白質を与えるCryjIIのリーダー／プレプロ位置を表すということはある。アミノ酸51及び54で始まる配列は、アミノ酸46で始まる蛋白質の分解生成物を表す。von Heijneの方法（Nucleic Acids Res. (1986) 14:4683-4690）を用いて、図4のアミノ酸22と23の間に予想される開裂部位がある。もし成熟CryjII蛋白質が図4のアミノ酸23で始まるならば、その蛋白質は、492アミノ酸長であって予想分子量54.2kDa及び予想pI9.0を有するであろう。

Swiss-ProtデータベースのCryjII配列についてのサーチは、CryjIIが、コーン、トウモロコシのポリガラクトナーゼに対して、43.3%相同（トマト（*Lycopersicon esculentum*）のポリガラクトナーゼに33.3%同一）及び48.4%相同（32.6%同一）であることを示した。すべてのヌクレオチド及び

アミノ酸配列分析は、PCGENE（カリフォルニア、Mountain View在、Intelligenetics）を用いて行なった。

#### 実施例4

日本で採集された杉花粉からのRNAの抽出及び組換えCryjIIの発現

日本で *Cryptomeria japonica* (杉) の木のプールから採集した新鮮な花粉を直ちにドライアイス上で凍結した。この花粉 500 mg から、本質的に Frankis 及び Mascarenhas Ann. Bot. 45:595-599 に記載されたようにして RNA を調製した。試料をドライアイス上で乳鉢と乳棒ですり潰して、一晩 0.1% DEPC で処理した 0.2 M NaCl、1 mM EDTA、1% SDS を加えた 5 ml の 50 mM トリス (pH 9.0) に懸濁させた。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1 で混合) で 5 回抽出した後に、RNA を、0.1 容の 3 M 酢酸ナトリウム及び 2 容のエタノールで水相から沈澱させた。ペレットを遠心分離で回収し、2 ml の d H<sub>2</sub>O に再懸濁させて 65℃ に 5 分間加熱した。これらの RNA 調製物に 2 ml の 4 M 塩化リチウムを加えて、一晩 0℃ でインキュベートした。遠心分離により RNA ペレットを回収して、1 ml の d H<sub>2</sub>O に再懸濁させ、再び 3 M 酢酸ナトリウム及びエタノールで一晩沈澱させた。最終的ペレットを 100 µl の d H<sub>2</sub>O に再懸濁させて -80℃ で保存した。

二本鎖 cDNA を、8 µl 花粉 RNA から、cDNA 合成システムキット (BR L) を用いて Gubler 及び Hoffman (1983) Gene 25:263-269 の方法に従ってオリゴ d T プライミングで合成した。PCR を、dNTP を含む 10 µl の 10× 緩衝液を各 100 pモルのセンスオリゴヌクレオチド及びアンチセンスオリゴヌクレオチド、cDNA (400 µl の二本鎖 cDNA 反応混合物の 10 µl)、0.5 µl の Amplitaq DNA ポリメラーゼ及び蒸留水 (100 µl にする) と混合して、GeneAmp DNA 増幅キット (Perkin Elmer Cetus) を用いて行なった。

これらの試料を、MJ Research, Inc. (マサチューセッツ、Cambridge 在) プログラム可能な温度制御装置を用いて増幅した。最初の 5 回の増幅は、94℃ で 1 分間の変性、45℃ で 1 分間のプライマーのテンプレートへのアニーリング及び 72℃ で 1 分間の鎖延長からなった。最後の 20 回の増幅は、上記の通りの変性、55℃ で 1 分間のアニーリング及び上記の通りの鎖延長からなった。

新たなプライマー対のセットを、開始 Met から停止コドンまでの Cryj II cDNA の増幅用に合成した。CP-52 (配列番号: 50) は、配列 5'-GCCGAATTC

ATGGCCATGAAATTAATT-3'を有し、ここに、ヌクレオチド配列5'-GCCGAATTC-3'（配列番号：51）（CP-52の塩基1～9）は、クローニング目的のために加えたEcoRI制限部位を表し、残りの配列は図4のヌクレオチド

42～59に対応する。CP-53（配列番号：52）は、配列5'-CGGGGATCCTCATTTATGGATGGTAGAT-3'を有し、ここに、ヌクレオチド配列5'-CGGGGATCC-3'（配列番号：53）（CP-53の塩基1～9）は、クローニング目的のために加えられたBamHI制限部位を表し、残りのCP-53のオリゴヌクレオチド配列は、図4のヌクレオチド1572～1589に対応するコード鎖配列に相補的である。CP-52及びCP-53を用いる二本鎖杉花粉cDNAでのPCR反応は、EtBr染色したアガロースミニゲル上で約1.55kbのバンドを生じ、JC145と呼ばれた。増幅されたDNAを、逐次的なクロロホルム、フェノール及びクロロホルム抽出と、その後の-20℃での0.5容の7.5酢酸アンモニウム及び1.5容のイソプロパノールでの沈澱により回収した。沈澱及び70%エタノールでの洗浄の後に、DNAを、15μlの反応にて、EcoRIとBamHIで同時に消化し、調製用1%SeaPlaque低融点ゲル（FMC）中で電気泳動した。適当な寸法のDNAバンドをEtBr染色により可視化し、取り出し、市販の配列決定用キット（例えば、Cleveland在、U.S.Biochemicals）を用いるジデオキシチエンターミネーション法（Sanger等（1977）Proc.Natl.Acad.Sci.USA74:5463-5476）によるジデオキシDNA配列決定のために適当に消化したpUC19中に繋いだ。

クローンpUC19JC145a及びpUC19JC

145bを、M13順方向及び逆向プライマー（マサチューセツツ、Beverly在、N.E.Bio labs）及び内部配列決定用プライマーCP-41、CP-42、CP-44、CP-46及びCP-51を用いて、完全に配列決定した。クローンpUC19JC145a及びpUC19JC145bのヌクレオチド及び演繹されたアミノ酸配列は、図4のCryjII配列と同一であったが、次の点を除く。クローンpUC19JC145aは、前に知られたCryjII配列との単一のヌクレオチドの違いを含

むことが見出された。それは、図4のヌクレオチド位置1234に、以前に記載されたTではなくCを有する。このヌクレオチド変化は、CryjII蛋白質のアミノ酸398に、I l eからT h rへの予想されるアミノ酸変化を生じる。クローンpUC19JC145bは、図4のヌクレオチド位置1088に、以前に記載されたAではなくGを有し、ヌクレオチド1339にGの代りにAを有する。1088におけるヌクレオチド変化はサイレントであり、予想されるアミノ酸変化を生じない。位置1339でのヌクレオチド変化は、CryjII蛋白質のアミノ酸433におけるS e rからA s nへの予想されるアミノ酸変化を生じる。これらの多形の何れも、未だ、独立に誘導されたPCRクローン又は直接アミノ酸配列決定によって確認されておらず、T a qポリメラーゼの本来のエラー率によるものであろう(約 $2 \times 10^{-4}$ 、Saiki等(1988) Science 239:487-491)。しかしながら、かかるヌクレ

オチド及びアミノ酸の一次配列における多形は、予想されるものである。

CryjIIの発現を以下に行なった。10gのpUC19JC145bをE c o R I及びB a m H Iで同時に消化した。CryjIIをコードするヌクレオチド挿入物(図4のヌクレオチド42~1589に及ぶ)を、この消化の1%SeaPlaque 低融点アガロースゲル中での電気泳動により単離した。次いで、この挿入物を、ユニークなE c o R Iエンドヌクレアーゼ制限部位が後に続くA T G開始コドンの直3'側の6ヒスチジン(H i s 6)をコードする配列を含むように改変した適当に消化した発現ベクターp E T-11d(ウイコンシ、Madison在、Noagen; Jameel等(1990) J. Virol. 64:3963-3966)中にライゲーションした。隣接するC l a I及びH i n d I I Iエンドヌクレアーゼ制限部位と共にベクター中の第2のE c o R Iエンドヌクレアーゼ制限部位を、予めE c o R I及びH i n d I I I消化、鈍端化及びライゲーションにより除去した。このヒスチジン(H i s 6)の配列は、組換え蛋白質(CryjI)のN i<sup>2+</sup>キレーティングカラムにおけるアフィニティー精製のために加えられた(Hochuli等(1987) J.Chromatog. 411:177-184; Hochuli等(1988) Bio/Tech. 6:1321-1325)。組換えクローンをを用いて大腸菌株B L 2 1-D E 3をトランスフォームしたが、該株は、T 7ポリメラー

ぜをコードする遺伝子に先行するイソプロピルー $\beta$ -D-チオガラクト

ピラノシド (IPTG) 誘導可能なプロモーターを有するプラスミッドを有する。  
IPTGでの誘導は、pET-11dにおける組換え蛋白質の発現に必要な高レベルのT7ポリメラーゼ発現へと導く。クローンpET-11d $\Delta$ HRhis6JC145b. aは、発現のための正しいリーディングフレーム中のCryjIIクローンであることが、CP-39を用いるジデオキシ配列決定 (Sanger等、前出) により確認された。

組換え蛋白質の発現を、初期小規模培養で試験した。クローンpET-11d $\Delta$ HRhis6JC145b. aの一晩培養を用いて、アンピシリンを含む50 mlの培地 (Brain Heart Infusion Media, Difco) に接種し、 $A_{600} = 1.0$ まで成育させ、次いで、IPTG (終濃度1 mM) で2時間誘導した。この細菌の1 mlのアリコートを生菌の前後で採取して、遠心分離によりペレット化し、そのペレットを50 mM トリスHCl (pH 6.8) 2 mM EDTA、1% SDS、 $\beta$ -メルカプトエタノール、10% グリセロール、0.25% ブロモフェノールブルー中で5分間煮沸することにより粗細胞溶解物を調製した (Studier等、(1990) *Methods in Enzymology* 185:60-89)。組換え蛋白質発現を、Sambrook等、前出の方法に従って、クーマシーブルー染色した12% SDS-PAGEゲル上で試験した (ゲルには、25  $\mu$ lの粗溶解物を載せた)。陰性対照は、誘導していないCryjIIのプラスミッドを含有す

る細菌からの粗溶解物からなった。His6リーダーを有する組換えCryjIIについて予想されるサイズの58 Kdの範囲には、何れの組換え大腸菌蛋白質の産生の著しい増加はなかった。

次いで、このpET-11d $\Delta$ HRhis6JC145b. aクローンを何れかの組換え蛋白質が発現されたか否かを調べるために大規模に成育させた。組換えプラスミッドを含む培養細菌2 mlを8時間成育させ、次いで、3  $\mu$ lを、200  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むLB培地 (メリランド、Gaithersburg在、Gibco-BRL) 中の1.5%アガロースを含む6個の各ペトリ皿 (100 $\times$ 15 mm)

上に線状にこすり付け、集密になるまで一晩成育させ、次いで、掻き取ってアンピシリン ( $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含む6 Lの液体培地 (Brain Heart Infusion培地, Difco) に加えた。この培養を、吸光度 $A_{600}$  が1.0になるまで成育させ、IPTGを加え (終濃度1 mM)、更に2時間成育させた。

細菌を遠心分離 ( $7,930 \times g$ , 10分間) により回収して、50 mlの6 M グアニジン-HCl、0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH8.0) 中で激しく震盪しながら1時間溶解させた。不溶性物質を遠心分離 ( $11,000 \times g$ , 10分間,  $4^\circ\text{C}$ ) により除去した。溶解物のpHを8.0に調節し、6 M グアニジン-HCl、100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH8.0) で平衡化した50 mlのニッケルNTAアガロースカラム

(Qiagen) に加えた。そのカラムを、6 M グアニジン-HCl、100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、10 mM トリス-HCl (pH8.0) で、次いで、8 M 尿素、100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH8.0) で、最後に8 M 尿素、100 mM 酢酸ナトリウム、10 mM トリス-HCl (pH6.3) で、逐次的に洗った。カラムを、各緩衝液で、通過した流れの $A_{208}$  が0.05以下になるまで洗った。

組換え蛋白質CryjIは、8 M 尿素、100 mM酢酸ナトリウム、10 mM トリス-HCl (pH4.5) で溶出され、10 mlのアリコートで採集した。各画分の蛋白質濃度を、 $A_{280}$  の吸収により測定して、ピーク画分をプールした。採集した組換え蛋白質のアリコートを、Sambrook等、前出の方法に従って、SDS-PAGEで分析した。

この6 Lの調製物、JC11pET-1は、1.5 mgの組換えCryjIIを産生したが、それは、SDS-PAGEにおいて24 kDa及び58 kDaの2本の主要バンドに分離された。この58 kDaのバンドは、組換えCryjIIを表すが、濃度測定 (Shimazu Flying Spot Scanner、マサチューセッツ、Braintree在、Shimazu Scientific Instruments) により測定したところ全蛋白質の約9~10%であった。24 kDaのバンドは、全蛋白質の約90%を説明し、組換えCryjIIの分解生成物又は大腸菌夾雑物を表すのであろう。



他のCryjII発現用構築物を、pUC19JC140iii dCryjII挿入物の適当に消化したpET11dΔHR（6ヒスチジンリーダーを有する）中へのライゲーションにより作成した。このベクターを、挿入物がEcoRI部位（5' pET11dΔHR挿入物接続）及びAsp718部位（挿入物の3' 末端）を与える他のpET11dΔHR構築物から誘導した。この構築物をこれらの2種の酵素で消化し、上記の低融点ミニゲルにて電気泳動し、そしてベクターを低融点アガロース中のバンドとして回収した。pUC19JC140iii d構築物をEcoRI及びAsp718で消化してCryjII挿入物を放出させた（それを、低融点ミニゲルにて単離し、上記のように調製したEcoRI/Asp718消化したpET11dΔHRベクター中にライゲーションした）。5つのクローンが、挿入物/ベクター5' 接続部に正しいヌクレオチド配列を含むことが、CP-39を用いるジデオキシ配列決定（上記）により見出された。この新しい構築物は、発現させたときに、図4及び5に示すように、CryjIIのアミノ酸46で始まる。この組換え蛋白質は、rCryjIIΔ46と呼ばれる。50mlの小規模発現試験（上記のように実施）は、pET11dΔHRJC140iii d2と呼ばれるこの構築物からのrCryjIIΔ46の発現レベルがpET11dΔHRJC145b2からの初期発現レベルよりずっと高いことを示した。9Lの調製物（JCII pET-3）を上

記のように処理し、200mgのrCryjIIΔ46を純度80%（クーマシーブルー染色した12%SDS-PAGEゲルの濃度測定による測定）で産出した。

#### 実施例 5

##### 杉花粉起源のRNAのノーザンブロット分析

Arnold Arboretumの木及びブールした日本からの木の両方からの杉花粉から分離したRNAに関してノーザンブロット分析を行った。本質的に上記のSambrookの方法を用いて、Arnold Arboretum（マサチューセッツ、Boston）で採集した杉花粉から単離したRNA10μg及び日本の木から採集した杉花粉から単離したRNA15μgを、ホルムアルデヒド38%及び1X MOPS（20X=0.4M MOPS、0.02M EDTA、0.1M NaOAc、pH7.0）溶液を

含有する1.2%アガロースゲル上で泳動した。RNA試料（初めに酢酸ナトリウム1/10容積、エタノール2容積で沈殿させて容積を減少させ、 $\text{dH}_2\text{O}$  5.5  $\mu\text{l}$ に再懸濁させた）を、最終濃度ホルムアルデヒド15.5%、ホルムアミド42%、及び1.3X MOPS溶液を有するローディング色素を含有するホルムアルデヒド/ホルムアミド緩衝液10  $\mu\text{l}$ により泳動した。試料を10×SSC（20X=3M NaCl、0.3Mクエン酸ナトリウム）におけるキャピラリートランスファーによりGenescreen Plus（NEN Research Products、マサ

チューセツツ、ボストン）に移した後に、膜を80℃で2時間ベークし、3分間紫外線照射した。膜のプレハイブリダイゼーションは、4mLの0.5M  $\text{NaPO}_4$ （pH7.2）、1mM EDTA、1% BSA、及び7% SDS中60℃において1時間であった。アンチセンスプローブを非対称性PCRにより低メルトアガロース（上記）においてJC145の増幅で合成した。この場合、2  $\mu\text{l}$ のDNAを2  $\mu\text{l}$ のdNTPミックス（0.167mM dATP、0.167mM dTTP、0.167mM dGTP及び0.033mM dCTP）、2  $\mu\text{l}$ の10×PCR緩衝液、10  $\mu\text{l}$ の $^{32}\text{P}$ -dCTP（100  $\mu\text{Ci}$ ；Amersham、イリノイ、アーリントンハイツ）、1  $\mu\text{l}$ （100 pモル）のアンチセンスプライマーCP-17、0.5  $\mu\text{l}$ のTaqポリメラーゼ、及び $\text{dH}_2\text{O}$ により増幅して20  $\mu\text{l}$ にする。10×PCR緩衝液、dNTP及びTaqポリメラーゼはPerkin Elmer Cetus（コネチカット、ノアウオーク）からのものであった。増幅は94℃において45秒間30回数変性し、プライマーを60℃において45秒間テンプレートにアニールしかつ72℃において1分間鎖延長することからなるものであった。反応を、TE100  $\mu\text{l}$ を加えることによって停止させ、プローブを3ccのG-50スピнкаラム（TEで平衡にしたグラスウールを詰めた3ccのシリンジ中の2mlのG-50

Sephadex [Pharmacia、スエーデン、アップサラ]）で回収し、1500 TriCarb Liquid Scintillation C

ounter (Packard、イリノイ、ダウナースグローブ) でカウントした。プローブをプレハイブリダイジング緩衝液に  $10^6$  cpm/ml で加え、プレハイブリダイゼーションを  $60^{\circ}\text{C}$  において16時間行った。プロットを高緊縮条件:  $3 \times 65^{\circ}\text{C}$  における  $0.2 \times \text{SSC} / 1\% \text{SDS}$  による15分、において行い、次いでプラスチックラップにラップして  $-80^{\circ}\text{C}$  のフィルムに暴露した。このノーザンプロット分析の7時間暴露は、Arboretumの木から採集したRNA及び日本からのプールした木から採集したRNAの両方についておよそ1.7 kbにおいて単一の厚いバンドを示した。このメッセージはcDNAのPCR分析によって予測される通りのCryjIIについて予期されるサイズである。

#### 実施例6

##### CryjI、CryjII及び組換えCryjIIに対するIgEの直接結合アッセイ

コーニングアッセイプレート (#25882-96) を、 $4^{\circ}\text{C}$  で一晩、CryjI若しくはCryjIIで ( $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 又は組換えCryjII調製物 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) (約20%の純度) で、 $5 \mu\text{L}$  にてコート。被覆抗原を除去し、ウェルを0.5%セラチン、PVP (ポリビニルピロリドン) ( $1 \text{g}/\text{mL}$  PBS) で、

室温で2時間ブロックした ( $200 \mu\text{L}$  ウェル)。抗CryjIモノクローナル抗体4B11を、PBS-Tween20で、1:1000稀釈で開して、逐次稀釈した。ヒト血漿を、PBS-Tweenにて、1:2稀釈で開始して、逐次稀釈した。このために、IgE結合分析について選択した杉花粉アレルギーの徴候を示す患者からの23試料をセットした。第1の抗体のインキュベーションを  $4^{\circ}\text{C}$  で一晩行なった。PBS-Tweenでの3回の洗浄の後に、第2抗体を加え (ヤギ抗マウスIg又はヤギ抗ヒトIgE、両者とも1:2000) そして2時間室温でインキュベート ( $100 \mu\text{L}$  /ウェル)。この溶液を取り出し、1:10,000まで稀釈したストレプトアビジン-HRP Oを  $100 \mu\text{L}$  /ウェルで加えた。2~5分間発色させた。反応を、 $100 \mu\text{L}$  /ウェルの1M リン酸の添加により停止させた。プレートを450nmフィルターを有する Microplate IL310Autoreader (バーモント、Vinooski在、Biotek Instruments社) にて読んだ。2重のウェルの吸光度レベルを平均した。ELISAアッセイのグラフ化した結果 (稀釈の対数対

吸光度)を図7～15に示す。これらの結果の要約を図16に与える。血漿の第2稀釈(1:6)でバックグラウンドの2倍以上の読みであるものを陽性の結合結果(プラス符号で示す)とした。

図7において、モノクローナル抗体4B11及び7人の患者(バッチ1)の血漿IgEの結合応答を、被覆抗

原としての精製CryjIに対して示す。精製CryjIに対して高めたモノクローナル抗体は、全稀釈系列に対して結合の飽和レベルを示している。個々の患者の試料は、CryjI調製物に対するIgE結合の変わり易い応答を示す。1人の患者(1034番)は、この蛋白質調製物に対する検出可能な結合を有しない。すべての患者の試料は、杉花粉アレルギーの徴候を訴えた個人から得た。そして、それらのMAST評点の結果を図16に示す。図8は、図7と同じ抗体セットの天然の精製CryjIIに対する結合を表すグラフである。抗CryjIモノクローナル抗体4B11は、この調製物において陰性である(2つのアレルゲン抗原の間の交差反応性の欠如を示す)。一般に、この杉花粉のアレルゲン性成分に対する一層低い全体的応答があり、減少した結合を示す一層多くの患者の試料を伴う。しかしながら、1034番の患者はCryjIにおいて陰性であり、CryjIIに対する非常に強い反応性を示す。組換えCryjII(rCryjII)を用いる最後の抗原セットにおいて(図9)、モノクローナル抗体4B11の反応性は陰性であり、生化学的に精製したCryjIIと比較して、ヒトIgE試料の結合に更なる減少がある。1143番及び1146番の患者2人は、生化学的に精製した型に対して最強反応した患者(1034番)が陰性であるにもかかわらず、組換え型のCryjIIに対するIgE結合について明確に陽性である。図10～15は、同じ抗原セットの適用を、次の16人の患者(患者バッ

チ2及び患者バッチ3と呼ぶ)の直接結合分析について表している。

図16に示した表には、出荷前に血漿試料について市販のキットを用いて日本で実施したMAST評点及び上で概説した直接ELISAの結果を要約してある。2人の患者は、MASTアッセイにより陰性であったが、これらの患者の1人

(1143番)は、すべてのELISA抗原について陽性であった。各抗原についての陽性応答の数を示し、これは、種々のアレルゲン調製物の測定の相対的アレルゲン性を表す。これらの結果は、CryjIIが、ヒトアレルギー患者のIgE反応性により規定して、アレルゲンであること及びCryjIには反応性でないがCryjIに反応性の何人かの患者がいることを示す。この患者の集団における応答の頻度は、CryjIに対するよりCryjIIに対して一層低い。

#### 実施例7

##### CryjII及びCryjIIペプチドを用いた杉花粉アレルギー患者のT細胞の研究

##### CryjIIペプチドの合成

杉花粉CryjIの重複するペプチドを、標準的Fmoc/tBoc合成化学を用いて合成し、逆相HPLCにより精製した。図13は、これらの研究で用いたCryjIペプチドを示す。ペプチドの名称は、一貫している。

##### 杉花粉抗原ペプチドに対するT細胞応答

末梢血液単核細胞(PBMC)を、季節性鼻炎の臨床症状を示し且つ杉花粉に対するMAST及び/又は皮膚試験陽性の杉花粉アレルギー患者からの60mlのヘパリン化した血液のリンパ球分離培地(LSM)遠心分離によって精製した。長期T細胞系統を、完全培地(熱で不活性化した5%ヒトAB血清を補ったRPMI-1640、2mM L-グルタミン、100U/mlペニシリン/ストレプトマイシン、 $5 \times 10^{-5}$ M 2-メルカプトエタノール及び10mM HEPES)のバルク培養における $2 \times 10^6$ PBL/mlの、保湿した5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内での、20µg/mlの部分精製した天然CryjI(75%の純度で、図2の3本のバンドと類似した3本のバンドを含む)での37℃で7日間の刺激によって樹立し、CryjI反応性T細胞を選択した。この量のプライミング抗原は、殆どの杉花粉アレルギー患者からのT細胞の活性化に最適であることが測定された。生存細胞をLSM遠心分離により精製し、5単位/mlの組換えヒトIL-2及び5単位/mlの組換えヒトIL-4を補った完全培地中で、細胞がもはやリンホカインに反応せず且つ「休止した」と考えられるまで最長で3週間培養した。次いで、T細胞の、選択したペプチド、組換えCryjI(rCryjI)、精

製した天然CryjI又は組換えAmb a I. 1 (rAmb aI. 1) に対して増殖する能力を評価した。アッセイのために、 $2 \times 10^4$ の休止細胞を、 $2 \times 10^4$ のエプスタインバー

ウイルス (EBV) トランスフォームした自家B細胞 (後述のようにして調製した) ( $25,000$  RADでガンマー照射したもの) の存在下で、丸底96ウェルプレート of 2若しくは3ウェル中の $200 \mu\text{l}$ の容積の完全培地中で、 $2 \sim 50 \text{ pg/ml}$ のrCryjII、精製した天然CryjIIペプチドCryjIIA及びCryjIIB (天然のCryjI) で $2 \sim 4$ 日間再刺激した。次いで、各ウェルに、 $1 \mu\text{Ci}$ のトリチウム化チミジンを $16 \sim 20$ 時間加えた。取り込まれたカウントをガラス繊維フィルターマット上に集め、液体シンチレーション計数処理した。図12は、組換えCryjI、精製した天然CryjI及び組換えAmb a I. 1並びに上記のようにして合成した幾つかの抗原性ペプチドを用いるアッセイにおいて抗原量を変えることの効果を示している。幾つかのペプチドは、これらのアッセイにおいて、高濃度では阻害的であることが見出された。滴定を用いて、これらのペプチドのT細胞アッセイにおける投与量を最適化した。各ペプチドの滴定における最大応答を、刺激インデックス (S. I.) として表す。このS. I. は、ペプチドへの応答において細胞により取り込まれたカウント/分 (CPM) を、培地のみの中で細胞により取り込まれたCPMで除したものである。バックグラウンドの2倍以上のS. I. 値は、「陽性」と考えられ、そのペプチドがT細胞エピトープを含むことを示す。これらの陽性結果は、試験した患者の群の各ペプチドの平均刺激インデッ

クスの計算において使用した。図12に示したこれらの結果は、999番の患者が、組換えCryjI及び精製した天然CryjI並びにペプチドC J 1-2、3、20及び22に対してよく応答するが組換えAmb a I. 1には応答しないことを示している。これは、CryjIT細胞エピトープがこの特定のアレルギー患者からのT細胞により認識されること、並びにrCryjI並びにペプチドC J 1-2、3、20及び22がかかるT細胞エピトープを含むことを示す。更に、これらのエピトープ

は、しばしば、隣接する重複するペプチドで検出されず、従って、恐らく、反応性ペプチドの重複しない中央の残基に及ぶ。対照抗原でプライムされたT細胞又は他の抗原に対してCryjIプライムされたT細胞を用いるT細胞アッセイにおいて、有意の交差反応性は見出されなかった。

#### 抗原提示細胞としての利用のための（EBV）トランスフォームしたB細胞の調製

自家EBVトランスフォームした細胞系統を、25,000ラドでガンマー照射して、第2増殖アッセイ及び第2バルク刺激において抗原提示細胞として用いた。これらの細胞系統を、免疫蛍光フローサイトメトリー分析においても対照として用いた。これらのEBVトランスフォームした細胞系統を、 $5 \times 10^6$  PBLを1mlのB-59/8マーマーセット細胞系統（ATCC CRL1612、メリーランド、Rockville在、American Type Culture Collection）調整培地と共に、 $1 \mu\text{g/ml}$ の

フォルボール12-ミリステート13-アセテート（PMA）の存在下で、37℃で60分間、 $12 \times 75 \text{ mm}$ ポリエチレン製丸底Falconスナップキャップチューブ（ニュージャージー、Lincoln Park在、Becton Dickinson Labware）中でインキュベートすることにより作成した。これらの細胞を、次いで、前述のようにRPMI-1640にて $1.25 \times 10^6$ 細胞/mlに希釈した（但し、熱で不活性化したウシ胎児血清10%を補い、 $200 \mu\text{l}$ のアリコートを平底培養プレートにて肉眼でコロニーが検出されるまで培養した）。次いで、それらを、細胞系統が樹立されるまで、より大きいウェルに移した。

この発明が好適具体例に言及して記載されたにもかかわらず、他の具体例は、同じ結果に到達することが出来る。本発明の変形及び改変は、当業者には自明であり、すべてのかかる改変及び等価物は添付の請求の範囲に包含され且つ本発明の真の精神及び範囲に従うものである。

#### 配列表

（1）一般的情報：

## (i) 出願人：

(A) 名称：IMMULOGIC PHARMACEUTICAL CORPORATION

(B) 通り：610 Lincoln Street

(C) 市：Waltham

(D) 州：マサチューセッツ

(E) 国：USA

(F) 郵便番号：02154

(G) 電話：(617) 466-6000

(H) テレファックス：(617) 466-6040

## (ii) 発明の名称：杉花粉由来のアレルゲン性蛋白質及びペプチド

## (iii) 配列の数：55

## (iv) コンピューター読み取り可能形式：

(A) 媒体型：フロッピーディスク

(B) コンピューター：IBM PC 互換機

(C) オペレーティングシステム：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：ASCII (TEXT)

## (v) 現出願のデータ：

(A) 出願番号：

(B) 出願日：

## (vi) 先願のデータ：

(A) 出願番号：

(B) 出願日：

## (viii) 代理人の情報：

(A) 名称：Vanstone, Darlene

(B) 登録番号：35,729

(C) 参照/ドケット番号：IPC-033PC

## (ix) 電信用情報：

(A) 電話：(617) 466-6000

(B) テレファックス：(617) 466-6040



## (2) 配列番号1の情報:

## (i) 配列の特性:

(A) 長さ: 1726塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (ii) 配列の種類: cDNA

## (ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表わす記号: CDS

(B) 存在位置: 42..1586

## (xi) 配列 (配列番号1):

TGAGTTCGAG ACAAGTATAG AAAGAATTTT CTTTATTAA A ATG GCC ATG AAA  
53

Met Ala Met Lys  
1

TTA ATT GCT CCA ATG GCC TTT CTG GCC ATG CAA TTG ATT ATA ATG GCG  
101  
Leu Ile Ala Pro Met Ala Phe Leu Ala Met Gln Leu Ile Ile Met Ala  
5 10 15 20

GCA GCA GAA GAT CAA TCT GCC CAA ATT ATG TTG GAC AGT GTT GTC GAA  
149  
Ala Ala Glu Asp Gln Ser Ala Gln Ile Met Leu Asp Ser Val Val Glu  
25 30 35

AAA TAT CTT AGA TCG AAT CGG AGT TTA AGA AAA GTT GAG CAT TCT CGT  
197  
Lys Tyr Leu Arg Ser Asn Arg Ser Leu Arg Lys Val Glu His Ser Arg  
40 45 50

CAT GAT GCT ATC AAC ATC TTC AAT GTG GAA AAG TAT GGC GCA GTA GGC  
245  
His Asp Ala Ile Asn Ile Phe Asn Val Glu Lys Tyr Gly Ala Val Gly  
55 60 65

GAT GGA AAG CAT GAT TGC ACT GAG GCA TTT TCA ACA GCA TGG CAA GCT  
293  
Asp Gly Lys His Asp Cys Thr Glu Ala Phe Ser Thr Ala Trp Gln Ala  
70 75 80

GCA TGC AAA AAC CCA TCA GCA ATG TTG CTT GTG CCA GGC AGC AAG AAA  
341  
Ala Cys Lys Asn Pro Ser Ala Met Leu Leu Val Pro Gly Ser Lys Lys  
85 90 95 100

TTT GTT GTA AAC AAT CTG TTC TTC AAT GGG CCA TGT CAA CCT CAC TTT  
389  
Phe Val Val Asn Asn Leu Phe Phe Asn Gly Pro Cys Gln Pro His Phe  
105 110 115

ACT TTT AAG GTA GAT GGG ATA ATA GCT GCG TAC CAA AAT CCA GCG AGC  
437  
Thr Phe Lys Val Asp Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser  
120 125 130

TGG AAG AAT AAT AGA ATA TGG TTG CAG TTT GCT AAA CTT ACA GGT TTT  
485  
Trp Lys Asn Asn Arg Ile Trp Leu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe  
135 140 145

ACT CTA ATG GGT AAA GGT GTA ATT GAT GGG CAA GGA AAA CAA TGG TGG  
533  
Thr Leu Met Gly Lys Gly Val Ile Asp Gly Gln Gly Lys Gln Trp Trp  
150 155 160

GCT GGC CAA TGT AAA TGG GTC AAT GGA CGA GAA ATT TGC AAC GAT CGT  
581  
Ala Gly Gln Cys Lys Trp Val Asn Gly Arg Glu Ile Cys Asn Asp Arg  
165 170 175 180

GAT AGA CCA ACA GCC ATT AAA TTC GAT TTT TCC ACG GGT CTG ATA ATC

629  
 Asp Arg Pro Thr Ala Ile Lys Phe Asp Phe Ser Thr Gly Leu Ile Ile  
 185 190 195  
  
 CAA GGA CTG AAA CTA ATG AAC AGT CCC GAA TTT CAT TTA GTT TTT GGG  
 677  
 Gln Gly Leu Lys Leu Met Asn Ser Pro Glu Phe His Leu Val Phe Gly  
 200 205 210  
  
 AAT TGT GAG GGA GTA AAA ATC ATC GGC ATT AGT ATT ACG GCA CCG AGA  
 725  
 Asn Cys Glu Gly Val Lys Ile Ile Gly Ile Ser Ile Thr Ala Pro Arg  
 215 220 225  
  
 GAC AGT CCT AAC ACT GAT GGA ATT GAT ATC TTT GCA TCT AAA AAC TTT  
 773  
 Asp Ser Pro Asn Thr Asp Gly Ile Asp Ile Phe Ala Ser Lys Asn Phe  
 230 235 240  
  
 CAC TTA CAA AAG AAC ACG ATA GGA ACA GGG GAT GAC TGC GTC GCT ATA  
 821  
 His Leu Gln Lys Asn Thr Ile Gly Thr Gly Asp Asp Cys Val Ala Ile  
 245 250 255 260  
  
 GGC ACA GGG TCT TCT AAT ATT GTG ATT GAG GAT CTG ATT TGC GGT CCA  
 869  
 Gly Thr Gly Ser Ser Asn Ile Val Ile Glu Asp Leu Ile Cys Gly Pro  
 265 270 275  
  
 GGC CAT GGA ATA AGT ATA GGA AGT CTT GGG AGG GAA AAC TCT AGA GCA  
 917  
 Gly His Gly Ile Ser Ile Gly Ser Leu Gly Arg Glu Asn Ser Arg Ala  
 280 285 290  
  
 GAG GTT TCA TAC GTG CAC GTA AAT GGG GCT AAA TTC ATA GAC ACA CAA  
 965  
 Glu Val Ser Tyr Val His Val Asn Gly Ala Lys Phe Ile Asp Thr Gln  
 295 300 305  
  
 AAT GGA TTA AGA ATC AAA ACA TGG CAG GGT GGT TCA GGC ATG GCA AGC  
 1013  
 Asn Gly Leu Arg Ile Lys Thr Trp Gln Gly Gly Ser Gly Met Ala Ser  
 310 315 320  
  
 CAT ATA ATT TAT GAG AAT GTT GAA ATG ATA AAT TCG GAG AAC CCC ATA  
 1061  
 His Ile Ile Tyr Glu Asn Val Glu Met Ile Asn Ser Glu Asn Pro Ile  
 325 330 335 340  
  
 TTA ATA AAT CAA TTC TAC TGC ACT TCA GCT TCT GCT TGC CAA AAC CAG  
 1109  
 Leu Ile Asn Gln Phe Tyr Cys Thr Ser Ala Ser Ala Cys Gln Asn Gln  
 345 350 355  
  
 AGG TCT GCG GTT CAA ATC CAA GAT GTG ACA TAC AAG AAC ATA CGT GGG  
 1157  
 Arg Ser Ala Val Gln Ile Gln Asp Val Thr Tyr Lys Asn Ile Arg Gly  
 360 365 370  
  
 ACA TCA GCA ACA GCA GCA GCA ATT CAA CTT AAG TGC AGT GAC AGT ATG  
 1205  
 Thr Ser Ala Thr Ala Ala Ala Ile Gln Leu Lys Cys Ser Asp Ser Met  
 375 380 385  
  
 CCC TGC AAA GAT ATA AAG CTA AGT GAT ATA TCT TTG AAG CTT ACC TCA  
 1253

```

Pro Cys Lys Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ile Ser Leu Lys Leu Thr Ser
390                               395                               400
GGG AAA ATT GCT TCC TGC CTT AAT GAT AAT GCA AAT GGA TAT TTC AGT
1301
Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Asp Asn Ala Asn Gly Tyr Phe Ser
405                               410                               415                               420
GGA CAC GTC ATC CCT GCA TGC AAG AAT TTA AGT CCA AGT GCT AAG CGA
1349
Gly His Val Ile Pro Ala Cys Lys Asn Leu Ser Pro Ser Ala Lys Arg
425                               430                               435
AAA GAA TCT AAA TCC CAT AAA CAC CCA AAA ACT GTA ATG GTT GAA AAT
1397
Lys Glu Ser Lys Ser His Lys His Pro Lys Thr Val Met Val Glu Asn
440                               445                               450
ATG CGA GCA TAT GAC AAG GGT AAC AGA ACA CGC ATA TTG TTG GGG TCG
1445
Met Arg Ala Tyr Asp Lys Gly Asn Arg Thr Arg Ile Leu Leu Gly Ser
455                               460                               465
AGG CCT CCG AAT TGT ACA AAC AAA TGT CAT GGT TGC AGT CCA TGT AAG
1493
Arg Pro Pro Asn Cys Thr Asn Lys Cys His Gly Cys Ser Pro Cys Lys
470                               475                               480
GCC AAG TTA GTT ATT GTT CAT CGT ATT ATG CCG CAG GAG TAT TAT CCT
1541
Ala Lys Leu Val Ile Val His Arg Ile Met Pro Gln Glu Tyr Tyr Pro
485                               490                               495                               500
CAG AGG TGG ATA TGC AGC TGT CAT GGC AAA ATC TAC CAT CCA TAATGAGATA
1593
Gln Arg Trp Ile Cys Ser Cys His Gly Lys Ile Tyr His Pro
505                               510
CATTGAAACT GTATGTGCTA GTGAATATTC TTGTGGTACA ATATTAGAAC TGATATTGAA
1653
AATAAATCAT CAATGTTTCT AAGGCATTTA TAATAGATTA TATTAAATGGT TCAGCCTGGT
1713
GCAAAAAAAAA AAA
1726

```

## (2) 配列番号2の情報:

## (i) 配列の特性:

(A) 長さ: 514アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

## (ii) 配列の種類: 蛋白質

## (xi) 配列 (配列番号2):

```

Met Ala Met Lys Leu Ile Ala Pro Met Ala Phe Leu Ala Met Gln Leu
1           5           10           15
Ile Ile Met Ala Ala Ala Glu Asp Gln Ser Ala Gln Ile Met Leu Asp
20           25           30

```

Ser Val Val Glu Lys Tyr Leu Arg Ser Asn Arg Ser Leu Arg Lys Val  
 35 40 45  
 Glu His Ser Arg His Asp Ala Ile Asn Ile Phe Asn Val Glu Lys Tyr  
 50 55 60  
 Gly Ala Val Gly Asp Gly Lys His Asp Cys Thr Glu Ala Phe Ser Thr  
 65 70 75 80  
 Ala Trp Gln Ala Ala Cys Lys Asn Pro Ser Ala Met Leu Leu Val Pro  
 85 90 95  
 Gly Ser Lys Lys Phe Val Val Asn Asn Leu Phe Phe Asn Gly Pro Cys  
 100 105 110  
 Gln Pro His Phe Thr Phe Lys Val Asp Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln  
 115 120 125  
 Asn Pro Ala Ser Trp Lys Asn Asn Arg Ile Trp Leu Gln Phe Ala Lys  
 130 135 140  
 Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Lys Gly Val Ile Asp Gly Gln Gly  
 145 150 155 160  
 Lys Gln Trp Trp Ala Gly Gln Cys Lys Trp Val Asn Gly Arg Glu Ile  
 165 170 175  
 Cys Asn Asp Arg Asp Arg Pro Thr Ala Ile Lys Phe Asp Phe Ser Thr  
 180 185 190  
 Gly Leu Ile Ile Gln Gly Leu Lys Leu Met Asn Ser Pro Glu Phe His  
 195 200 205  
 Leu Val Phe Gly Asn Cys Glu Gly Val Lys Ile Ile Gly Ile Ser Ile  
 210 215 220  
 Thr Ala Pro Arg Asp Ser Pro Asn Thr Asp Gly Ile Asp Ile Phe Ala  
 225 230 235 240  
 Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Ile Gly Thr Gly Asp Asp  
 245 250 255  
 Cys Val Ala Ile Gly Thr Gly Ser Ser Asn Ile Val Ile Glu Asp Leu  
 260 265 270  
 Ile Cys Gly Pro Gly His Gly Ile Ser Ile Gly Ser Leu Gly Arg Glu  
 275 280 285  
 Asn Ser Arg Ala Glu Val Ser Tyr Val His Val Asn Gly Ala Lys Phe  
 290 295 300  
 Ile Asp Thr Gln Asn Gly Leu Arg Ile Lys Thr Trp Gln Gly Gly Ser  
 305 310 315 320  
 Gly Met Ala Ser His Ile Ile Tyr Glu Asn Val Glu Met Ile Asn Ser  
 325 330 335  
 Glu Asn Pro Ile Leu Ile Asn Gln Phe Tyr Cys Thr Ser Ala Ser Ala  
 340 345 350  
 Cys Gln Asn Gln Arg Ser Ala Val Gln Ile Gln Asp Val Thr Tyr Lys  
 355 360 365  
 Asn Ile Arg Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala Ala Ile Gln Leu Lys Cys  
 370 375 380

```

Ser Asp Ser Met Pro Cys Lys Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ile Ser Leu
385                               390                               395                               400

Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Asp Asn Ala Asn
                               405                               410                               415

Gly Tyr Phe Ser Gly His Val Ile Pro Ala Cys Lys Asn Leu Ser Pro
                               420                               425                               430

Ser Ala Lys Arg Lys Glu Ser Lys Ser His Lys His Pro Lys Thr Val
                               435                               440                               445

Met Val Glu Asn Met Arg Ala Tyr Asp Lys Gly Asn Arg Thr Arg Ile
450                               455                               460

Leu Leu Gly Ser Arg Pro Pro Asn Cys Thr Asn Lys Cys His Gly Cys
465                               470                               475                               480

Ser Pro Cys Lys Ala Lys Leu Val Ile Val His Arg Ile Met Pro Gln
                               485                               490                               495

Glu Tyr Tyr Pro Gln Arg Trp Ile Cys Ser Cys His Gly Lys Ile Tyr
                               500                               505                               510

His Pro

```

## (2) 配列番号3の情報:

## (i) 配列の特性:

(A) 長さ: 45 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

## (ii) 配列の種類: ペプチド

## (v) フラグメント型: 中間部

## (xi) 配列 (配列番号3):

```

Arg Lys Val Glu His Ser Arg His Asp Ala Ile Asn Ile Phe Asn Val
1                               5                               10                               15

Glu Lys Tyr Gly Ala Val Gly Asp Gly Lys His Asp Cys Thr Glu Ala
                               20                               25                               30

Phe Ser Thr Ala Trp Gln Ala Ala Cys Lys Asn Pro Ser
35                               40                               45

```

## (2) 配列番号4の情報:

## (i) 配列の特性:

(A) 長さ: 41 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

## (ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型：中間部

(xi) 配列（配列番号 4）

```

Arg Lys Val Glu His Ser Arg His Asp Ala Ile Asn Ile Phe Asn Val
 1           5           10           15
Glu Lys Tyr Gly Ala Val Gly Asp Gly Lys His Asp Cys Thr Glu Ala
          20           25           30
Phe Ser Thr Ala Trp Gln Lys Asn Pro
          35           40

```

(2) 配列番号 5 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：36 アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(v) フラグメント型：中間部

(xi) 配列（配列番号 5）：

```

Ser Arg His Asp Ala Ile Asn Ile Phe Asn Val Glu Lys Tyr Gly Ala
 1           5           10           15
Val Gly Asp Gly Lys His Asp Cys Thr Glu Ala Phe Ser Thr Ala Trp
          20           25           30
Gln Lys Asn Pro
          35

```

(2) 配列番号 6 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：10 アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(v) フラグメント型：中間部

(xi) 配列（配列番号 6）：

```

Ala Ile Asn Ile Phe Asn Val Glu Lys Tyr
 1           5           10

```

## (2) 配列番号 7 の情報 :

## (i) 配列の特性 :

(A) 長さ : 1 4 1 0 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : cDNA

(xi) 配列 (配列番号 7)



AGAAAAGTTG AGCATTCTCG TCATGATGCT ATCAACATCT TCAATGTGGA AAAGTATGGC  
60  
GCAGTAGGCG ATGGAAAGCA TGATTGCACT GAGGCATTTT CAACAGCATG GCAAGCTGCA  
120  
TGCAAAAACC CATCAGCAAT GTTGCTTG TG CCAGGCAGCA AGAAATTTGT TGTAAACAAT  
180  
CTGTTCTTCA ATGGGCCATG TCAACCTCAC TTTACTTTTA AGGTAGATGG GATAATAGCT  
240  
GCGTACCAAA ATCCAGCGAG CTGGAAGAAT AATAGAATAT GGTTCAGTT TGCTAACTT  
300  
ACAGGTTTTA CTCTAATGGG TAAAGGTGTA ATTGATGGGC AAGGAAAACA ATGGTGGGCT  
360  
GGCCAATGTA AATGGGTCAA TGGACGAGAA ATTTGCAACG ATCGTGATAG ACCAACAGCC  
420  
ATTAAATTCG ATTTTCCAC GGGTCTGATA ATCCAAGGAC TGAAACTAAT GAACAGTCCC  
480  
GAATTCATT TAGTTTTGG GAATTGTGAG GGAGTAAAA TCATCGGCAT TAGTATTACG  
540  
GCACCGAGAG ACAGTCCTAA CACTGATGGA ATTGATATCT TTGCATCTAA AAACCTTCAC  
600  
TTACAAAAGA ACACGATAGG AACAGGGGAT GACTGCGTCG CTATAGGCAC AGGGTCTTCT  
660  
AATATTGTGA TTGAGGATCT GATTTGCGGT CCAGGCCATG GAATAAGTAT AGGAAGTCTT  
720  
GGGAGGGAAA ACTCTAGAGC AGAGGTTTCA TACGTGCACG TAAATGGGGC TAAATTCATA  
780  
GACACACAAA ATGGATTAAG AATCAAAACA TGGCAGGGTG GTTCAGGCAT GGCAAGCCAT  
840  
ATAATTTATG AGAATGTTGA AATGATAAAT TCGGAGAACC CCATATTAAT AAATCAATTC  
900  
TACTGCACTT CAGCTTCTGC TTGCCAAAAC CAGAGGTCTG CGGTTCAAAT CCAAGATGTG  
960  
ACATACAAGA ACATACGTGG GACATCAGCA ACAGCAGCAG CAATCAACT TAAGTGCAGT  
1020  
GACAGTATGC CCTGCAAAGA TATAAAGCTA AGTGATATAT CTTTGAAGCT TACCTCAGGG  
1080  
AAAATTGCTT CCTGCCTTAA TGATAATGCA AATGGATATT TCAGTGGACA CGTCATCCCT  
1140  
GCATGCAAGA ATTTAAGTCC AAGTGCTAAG CGAAAAGAAT CTAATCCCA TAAACACCCA  
1200  
AAAACGTAA TGTTGAAAA TATGCGAGCA TATGACAAGG GTAACAGAAC ACGCATATTG  
1260  
TTGGGGTCGA GGCCTCCGAA TTGTACAAAC AAATGTCATG GTTGCACTCC ATGTAAGGCC  
1320  
AAGTTAGTTA TTGTTTCATG TATTATGCCG CAGGAGTATT ATCCTCAGAG GTGGATATGC  
1380  
AGCTGTCATG GCAAAATCTA CCATCCATAA  
1410

## (i) 配列の特性：

(A) 長さ：1395塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

## (ii) 配列の種類：cDNA

## (xi) 配列（配列番号8）：

TCTCGTCATG ATGCTATCAA CATCTTCAAT GTGGAAAAGT ATGGCGCAGT AGGCGATGGA  
60

AAGCATGATT GCACTGAGGC ATTTTCAACA GCATGGCAAG CTGCATGCAA AAACCCATCA  
120

GCAATGTTGC TTGTGCCAGG CAGCAAGAAA TTTGTTGTAA ACAATCTGTT CTTCAATGGG  
180

CCATGTCAAC CTCACTTTAC TTTTAAGGTA GATGGGATAA TAGCTGCGTA CCAAAATCCA  
240

GCGAGCTGGA AGAATAATAG AATATGGTTG CAGTTTGCTA AACTTACAGG TTTTACTCTA  
300

ATGGGTAAAG GTGTAATTGA TGGGCAAGGA AAACAATGGT GGGCTGGCCA ATGTAAATGG  
360

GTCAATGGAC GAGAAATTTG CAACGATCGT GATAGACCAA CAGCCATTAA ATTCGATTTT  
420

TCCACGGGTC TGATAATCCA AGGACTGAAA CTAATGAACA GTCCGAATT TCATTTAGTT  
480

TTTGGGAATT GTGAGGGAGT AAAATCATC GGCATTAGTA TTACGGCACC GAGAGACAGT  
540

CCTAACACTG ATGGAATTGA TATCTTTGCA TCTAAAACT TTCATTACA AAAGAACACG  
600

ATAGGAACAG GGGATGACTG CGTCGCTATA GGCACAGGGT CTTCTAATAT TGTGATTGAG  
660

GATCTGATTT GCGGTCCAGG CCATGGAATA AGTATAGGAA GTCTTGGGAG GGAAAACTCT  
720

AGAGCAGAGG TTTCATACGT GCACGTAAAT GGGGCTAAAT TCATAGACAC ACAAATGGA  
780

TTAAGAATCA AAACATGGCA GGGTGTTTCA GGCATGGCAA GCCATATAAT TTATGAGAAT  
840

GTTGAAATGA TAAATTCGGA GAACCCCATTA TTAATAAATC AATTCTACTG CACTTCAGCT  
 900  
 TCTGCTTGCC AAAACCAGAG GTCTGCGGTT CAAATCCAAG ATGTGACATA CAAGAACATA  
 960  
 CGTGGGACAT CAGCAACAGC AGCAGCAATT CAACTTAAGT GCAGTGACAG TATGCCCTGC  
 1020  
 AAAGATATAA AGCTAAGTGA TATATCTTTG AAGCTTACCT CAGGGAAAAT TGCTTCCTGC  
 1080  
 CTTAATGATA ATGCAAATGG ATATTTTCAGT GGACACGTCA TCCCTGCATG CAAGAATTTA  
 1140  
 AGTCCAAGTG CTAAGCGAAA AGAATCTAAA TCCCATAAAC ACCCAAAAAC TGTAATGGTT  
 1200  
 GAAAATATGC GAGCATATGA CAAGGGTAAC AGAACACGCA TATTGTTGGG GTCGAGGCCT  
 1260  
 CCGAATTGTA CAAACAAATG TCATGGTTGC AGTCCATGTA AGGCCAAGTT AGTTATTGTT  
 1320  
 CATCGTATTA TGCCGCAGGA GTATTATCCT CAGAGGTGGA TATGCAGCTG TCATGGCAAA  
 1380  
 ATCTACCATC CATAA  
 1395

## (2) 配列番号9の情報:

## (i) 配列の特性:

- (A) 長さ: 1479塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

## (ii) 配列の種類: cDNA

## (xi) 配列 (配列番号9):

GAAGATCAAT CTGCCCAAAT TATGTTGGAC AGTGTTGTCG AAAAATATCT TAGATCGAAT  
 60  
 CGGAGTTTAA GAAAAGTTGA GCATTCTCGT CATGATGCTA TCAACATCTT CAATGTGGAA  
 120  
 AAGTATGGCG CAGTAGGCGA TGGAAAGCAT GATTGCACTG AGGCATTTTC AACAGCATGG  
 180  
 CAAGCTGCAT GCAAAAACCC ATCAGCAATG TTGCTTGTGC CAGGCAGCAA GAAATTGTGT  
 240  
 GTAAACAATC TGTTCTTCAA TGGGCCATGT CAACCTCACT TACTTTTAA GGTAGATGGG  
 300  
 ATAATAGCTG CGTACCAAAA TCCAGCGAGC TGGGAAGAATA ATAGAATATG GTTGCAAGTT  
 360  
 GCTAAACTTA CAGGTTTAC TCTAATGGGT AAAGGTGTAA TTGATGGGCA AGGAAAACAA  
 420

TGGTGGGCTG GCCAATGTAA ATGGGTCAAT GGACGAGAAA TTTGCAACGA TCGTGATAGA  
480  
CCAACAGCCA TTAAATTCGA TTTTCCACG GGTCTGATAA TCCAAGGACT GAAACTAATG  
540  
AACAGTCCCG AATTTCAATTT AGTTTTTGGG AATTGTGAGG GAGTAAAAAT CATCGGCATT  
600  
AGTATTACGG CACCGAGAGA CAGTCCTAAC ACTGATGGAA TTGATATCTT TGCATCTAAA  
660  
AACTTTCACT TACAAAAGAA CACGATAGGA ACAGGGGATG ACTGCGTCGC TATAGGCACA  
720  
GGGTCTTCTA ATATTGTGAT TGAGGATCTG ATTTGCGGTC CAGGCCATGG AATAAGTATA  
780  
GGAAGTCTTG GGAGGGAAAA CTCTAGAGCA GAGGTTTCAT ACGTGCACGT AAATGGGGCT  
840  
AAATTCATAG ACACACAAAA TGGATTAAGA ATCAAAACAT GGCAGGGTGG TTCAGGCATG  
900  
GCAAGCCATA TAATTTATGA GAATGTTGAA ATGATAAATT CGGAGAACCC CATATTAATA  
960  
AATCAATTCT ACTGCACTTC AGCTTCTGCT TGCCAAAACC AGAGGTCTGC GGTTCAAATC  
1020  
CAAGATGTGA CATAAAGAA CATACTGGG ACATCAGCAA CAGCAGCAGC AATTCAACTT  
1080  
AAGTGCAGTG ACAGTATGCC CTGCAAAGAT ATAAAGCTAA GTGATATATC TTTGAAGCTT  
1140  
ACCTCAGGGA AAATTGCTTC CTGCCTTAAT GATAATGCAA ATGGATATTT CAGTGGACAC  
1200  
GTCATCCCTG CATGCAAGAA TTTAAGTCCA AGTGCTAAGC GAAAAGAATC TAAATCCCAT  
1260  
AAACACCCAA KAACTGTAAAT GGTGAAAAT ATGCGAGCAT ATGACAAGGG TAACAGAACA  
1320  
CGCATATTGT TGGGGTCGAG GCCTCCGAAT TGTACAAACA AATGTCATGG TTGCAGTCCA  
1380  
TGTAAGGCCA AGTTAGTIAT TGTTTCATCGT ATTATGCCGC AGGAGTATTA TCCTCAGAGG  
1440  
TGGATATGCA GCTGTCATGG CAAAATCTAC CATCCATAA  
1479

(2) 配列番号10の情報:

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 35塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号 10) :

GGGTCTAGAG GTACCGTCCG TCCGATCGAT CCATT  
35

(2) 配列番号 11 の情報 :

(i) 配列の特性 :

(A) 長さ : 13 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : cDNA

(xi) 配列 (配列番号 11) :

AATGATCGAT GCT  
13

(2) 配列番号 12 の情報 :

(i) 配列の特性 :

(A) 長さ : 18 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : cDNA

(xi) 配列 (配列番号 12) :

RTATYTTYTCN ACRTTAA  
18

(2) 配列番号 13 の情報 :

(i) 配列の特性 :

(A) 長さ : 13 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号13）：

GGGTCTAGAG GTA  
13

(2) 配列番号14の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：6アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(v) フラグメント型：中間部

(xi) 配列（配列番号14）：

Phe Asn Val Glu Lys Tyr  
1 5

(2) 配列番号15の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：27塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号15）：

CCTGCAGTAY TTYTCNACRT TRAAAT  
27

(2) 配列番号16の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：7塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号16）：

CCTGCAG  
7

(2) 配列番号17の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：7アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(v) フラグメント型：中間部

(xi) 配列（配列番号17）：

Ile Phe Asn Val Glu Lys Tyr  
1 5

(2) 配列番号18の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：27塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号18）：

CCTGCAGTAY TTYTCNACRT TRAADAT  
27

(2) 配列番号19の情報：

(i) 配列の特性：

- (A) 長さ：17塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号19）：

GCNATHAAYA THTTYAA  
17

(2) 配列番号20の情報：

(i) 配列の特性：

- (A) 長さ：6アミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(v) フラグメント型：中間部

(xi) 配列（配列番号20）：

Ala Ile Asn Ile Phe Asn  
1 5

(2) 配列番号21の情報：

(i) 配列の特性：

- (A) 長さ：28塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号21）：

GGAATTCCGC NATHAAYATH TTYAAYGT  
28



## (2) 配列番号22の情報:

## (i) 配列の特性:

- (A) 長さ: 8塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

## (ii) 配列の種類: cDNA

## (xi) 配列 (配列番号22):

GGAATTCC  
8

## (2) 配列番号23の情報:

## (i) 配列の特性:

- (A) 長さ: 7アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 直鎖状

## (ii) 配列の種類: ペプチド

## (v) フラグメント型: 中間部

## (xi) 配列 (配列番号23):

Ala Ile Asn Ile Phe Asn Val  
1 5

## (2) 配列番号24の情報:

## (i) 配列の特性:

- (A) 長さ: 20塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

## (ii) 配列の種類: cDNA

## (xi) 配列 (配列番号24):

GCYTCNGTRC ARTCRTGYTT  
20

(2) 配列番号25の情報:

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 7 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号25):

Lys His Asp Cys Thr Glu Ala  
1 5

(2) 配列番号26の情報:

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 28 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号26):

GGCTGCAGGT RCARTCRTGY TTNCCRTC  
28

(2) 配列番号27の情報:

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 8 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号27）：

GGCTGCAG  
8

(2) 配列番号28の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：7アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(v) フラグメント型：中間部

(xi) 配列（配列番号28）：

Asp Gly Lys His Asp Cys Thr  
1 5

(2) 配列番号29の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：21塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号29）：

ATGTTGGACA GTGTTGTCGA A  
21

(2) 配列番号30の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：29塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号30）：

GGGAATTCAG AAAAGTTGAG CATTCTCGT  
29

(2) 配列番号31の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：8塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号31）：

GGGAATTC  
8

(2) 配列番号32の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：19塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号32）：

GTTCTTCAAT GGGCCATGT  
19

(2) 配列番号33の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号33）：

GTGTTAGGAC TGTCTCTCGG  
20

(2) 配列番号34の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号34）：

TGTCCAGGCC ATGGAATAAG  
20

(2) 配列番号35の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号35）：

GCCTTACATG GACTGCAACC  
20

(2) 配列番号36の情報：

## (i) 配列の特性：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

## (ii) 配列の種類：cDNA

## (xi) 配列（配列番号36）：

TCCACGGGTC TGATAATCCA  
20

## (2) 配列番号37の情報：

## (i) 配列の特性：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

## (ii) 配列の種類：cDNA

## (xi) 配列（配列番号37）：

AGGCAGGAAG CAATTTTCCC  
20

## (2) 配列番号38の情報：

## (i) 配列の特性：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

## (ii) 配列の種類：cDNA

## (xi) 配列（配列番号38）：

TACTGCACTT CAGCTTCTGC  
20

(2) 配列番号39の情報:

(i) 配列の特性:

- (A) 長さ: 20塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号39):

GGGGGTCTCC GAATTATCA  
20

(2) 配列番号40の情報:

(i) 配列の特性:

- (A) 長さ: 20塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号40):

GGATATTTCA GTGGACACGT  
20

(2) 配列番号41の情報:

(i) 配列の特性:

- (A) 長さ: 20塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号41）：

TATTAGAAGA CCCTGCGCCT  
20

(2) 配列番号42の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号42）：

CCATGTAAGG CCAAGTTAGT  
20

(2) 配列番号43の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号43）：

ACACCTTTAC CCATTAGAGT  
20

(2) 配列番号44の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：20塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖



(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号 4 4）：

CTGTCCAACA TAATTGGGC  
20

(2) 配列番号 4 5 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：2 0 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号 4 5）：

CATGGCAGGG TGGTCAGGC  
20

(2) 配列番号 4 6 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：2 0 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号 4 6）：

TAGCCCCATT TACGTGCACG  
20

(2) 配列番号 4 7 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：2 0 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号 4 7）

TTGGGGTCGA GGCCTCCGAA  
20

(2) 配列番号 4 8 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：9 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号 4 8）：

TAAAAUGGC  
9

(2) 配列番号 4 9 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：9 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：cDNA

(xi) 配列（配列番号 4 9）：

AACAAUGGC  
9

(2) 配列番号 5 0 の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ : 2 7 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : cDNA

(xi) 配列 (配列番号 5 0) :

GCCGAATTCA TGGCCATGAA ATTAATT  
27

(2) 配列番号 5 1 の情報 :

(i) 配列の特性 :

(A) 長さ : 9 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : cDNA

(xi) 配列 (配列番号 5 1) :

GCCGAATTC  
9

(2) 配列番号 5 2 の情報 :

(i) 配列の特性 :

(A) 長さ : 2 7 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : cDNA

(xi) 配列 (配列番号 5 2) :

CGGGGATCCT CATTATGGAT GGTAGAT  
27

## (2) 配列番号53の情報:

## (i) 配列の特性:

(A) 長さ: 9塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列 (配列番号53):

CGGGGATCC  
9

## (2) 配列番号54の情報:

## (i) 配列の特性:

(A) 長さ: 13アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号54):

Phe Thr Phe Lys Val Asp Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln

1

5

10

## (2) 配列番号55の情報:

## (i) 配列の特性:

(A) 長さ: 14アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列 (配列番号55):

Asn Gly Tyr Phe Ser Gly His Val Ile Pro Ala Cys Lys Asn  
1 5 10

【図1a】

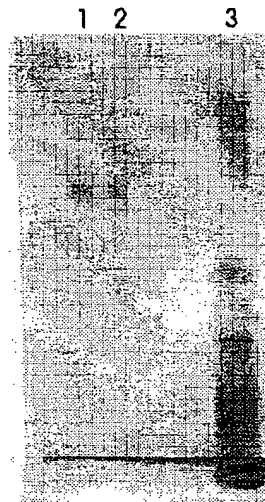


Fig. 1a

【図1b】

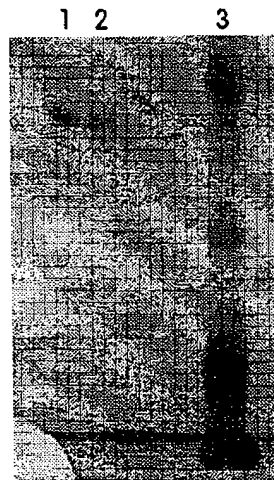


Fig. 1b

【图2】

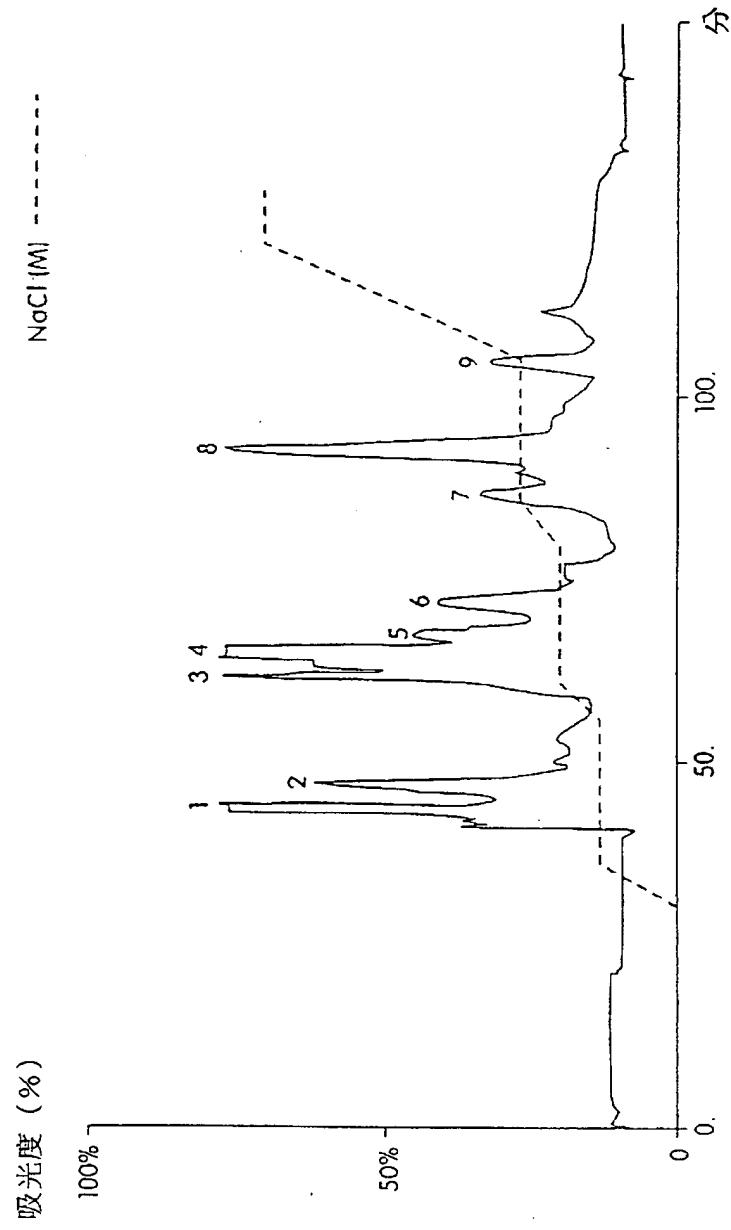


Fig. 2

【図 3】

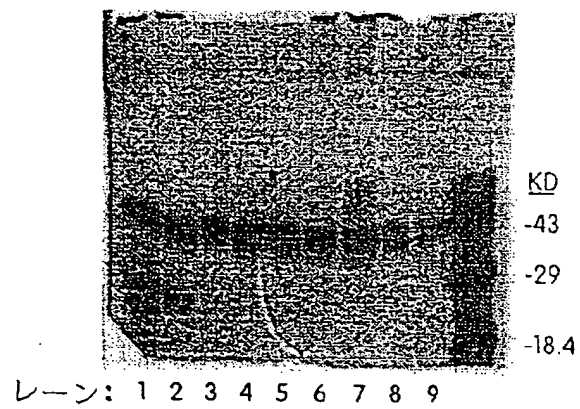


Fig. 3

[图4]

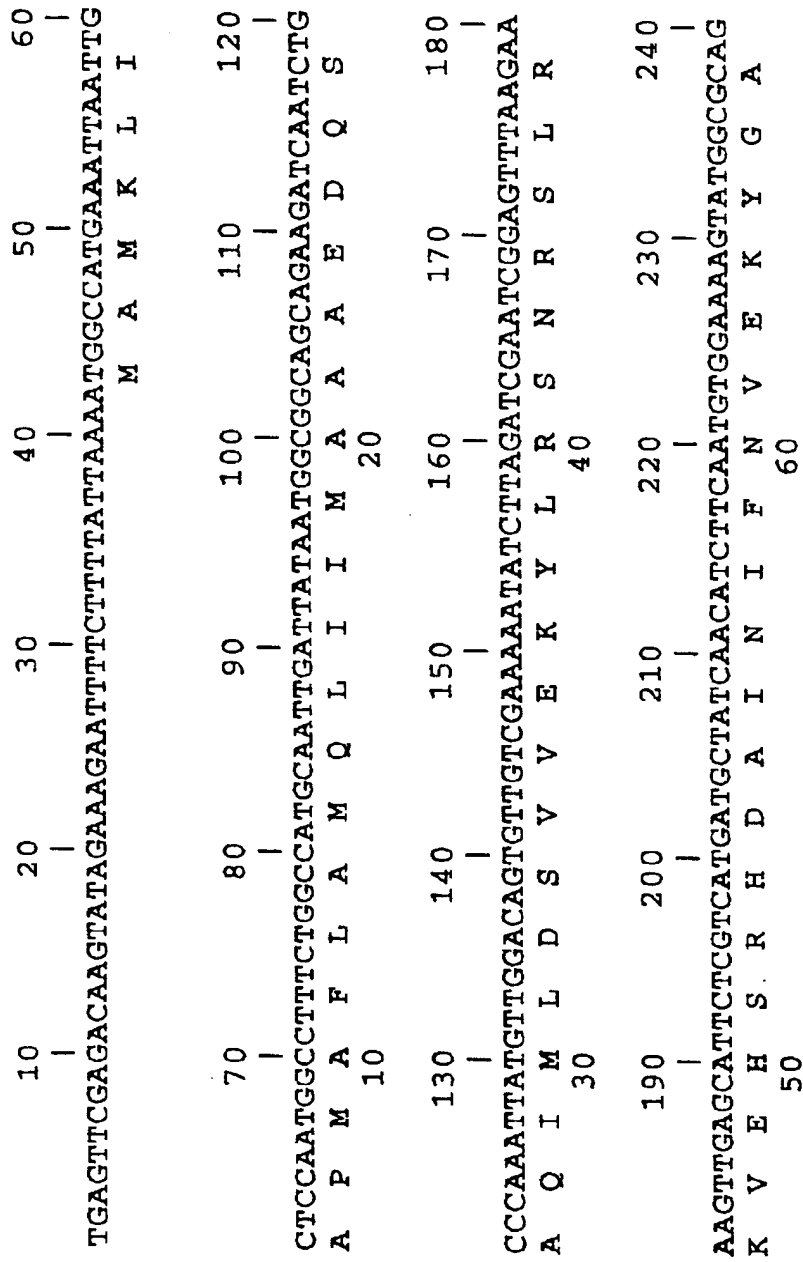


Fig. 4



[图4]

250	260	270	280	290	300
TAGGCGATGGAAGCATGATTGCAC	TGAGGCATTTCAACAGCATGGCA	AGCTGCATGCA			
V G D G K H D C T E A F S T A W Q A A C					
70	80				
310	320	330	340	350	360
AAAACCCATCAGCAATGTTGCTT	GTGCCAGGCAGCAAGAAATTG	TGTTGTAACAATCTGT			
K N P S A M L L V P G S K K F V V N N L					
90	100				
370	380	390	400	410	420
TCITTCAATGGGCCATGTCAACCT	CACCTTACTTTAAGGTAGATGG	GATAATAGCTGCGT			
F F N G P C Q P H F T F K V D G I I A A					
110	120				
430	440	450	460	470	480
ACCAAAATCCAGCGAGCTGGAAGA	ATAATAGAAATATGGTTGCAG	TTTGCTAAACTTACAG			
Y Q N P A S W K N N R I W L Q F A K L T					
130	140				

Fig. 4 Cont.

[图4]

490	500	510	520	530	540
I	I	I	I	I	I
GTTTACTCTAATGGGTAAAGGTGTAATTGATGGGCAAGGAAAACAATGGTGGGCTGGCC					
G F T L M G K G V I D G Q G K Q W W A G					
150			160		
550	560	570	580	590	600
I	I	I	I	I	I
AATGTAAATGGGTCAATGGACGAGAGAAATTGCAACGATCGTGATAGACCAACAGCCATTA					
Q C K W V N G R E I C N D R D R P T A I					
170			180		
610	620	630	640	650	660
I	I	I	I	I	I
AATTCGATTTTCCACGGGCTCTGATAATCCAAGGACTGAACATAATGAACAGTCCCGAAT					
K F D F S T G L I I I Q G L K L M N S P E					
190			200		
670	680	690	700	710	720
I	I	I	I	I	I
TTCAATTTAGTTTGGGAAATTGTAGGGAGTAAATAATCATCGGCATTAGTATACGGCAC					
F H L V F G N C E G V K I I G I S I T A					
210			220		

Fig. 4 Cont.

[图4]

730	740	750	760	770	780
CGAGAGACAGTCCTAACACTGATGGAATTGATATCTTTGCACTATAAAACTTTCACCTTAC					
P R D S P N T D G I D I F A S K N F H L					
230			240		
790	800	810	820	830	840
AAAAGAACACGATAGGAACACAGGGGATGACTGCGTCGTATAGGCACAGGGTCTTCTAATA					
Q K N T I G T G D D C V A I G T G S S N					
250			260		
850	860	870	880	890	900
TTGTGATTGAGGATCTGATTTCGGTCCAGGCCATGGAATAAGTATAGGAAGTCTTGGGA					
I V I E D L I C G P G H G I S I G S L G					
270			280		
910	920	930	940	950	960
GGGAAACTCTAGAGCAGAGGTTTCATACGTGCACCGTAAATGGGGCTAAATTCATAGACA					
R E N S R A E V S Y V H V N G A K F I D					
290			300		

Fig. 4 Cont.

[図4]

970	980	990	1000	1010	1020
CACAAAATGGATTAAGAATCAAAACATGGCAGGGTTCAGGCATGGCAAGCCATATAA					
T Q N G L R I K T W Q G G S G M A S H I					
310			320		
1030	1040	1050	1060	1070	1080
TTTATGAGAAATGTTGAAATGATAAATTCGGAGAACCCCATATTAATAATCAATTCTACT					
I Y E N V E M I N S E N P I L I N Q F Y					
330			340		
1090	1100	1110	1120	1130	1140
GCACTTCAGCTTCTGCTTGCCAAACACAGAGGCTCGGGTTCAAAATCCAAGATGTGACAT					
C T S A S A C Q N Q R S A V Q I Q D V T					
350			360		
1150	1160	1170	1180	1190	1200
ACAAGAACATACGTGGGACATCAGCAACACAGCAGCAGCAATTCAACTTAAGTGCAGTGACA					
Y K N I R G T S A T A A A I Q L K C S D					
370			380		

Fig. 4 Cont.

[图4]

1210	1220	1230	1240	1250	1260
GTATGCCCTGCAAAAGATATAAAGCTAAGTGATATATCTTTGAAGCTTACCTCAGGGAAA					
S M P C K D I K L S D I S L K L T S G K					
390			400		
1270	1280	1290	1300	1310	1320
TTGCTTCCTGCCTTAATGATAAATGCAAAATGGATATTTCAAGTGGACACGTCATCCCTGCAT					
I A S C L N D N A N G Y F S G H V I P A					
410			420		
1330	1340	1350	1360	1370	1380
GCAAGAAATTTAAGTCCCAAGTGCTAAGCGGAAAGAAATCTAAATCCCATAAACACCCAAAA					
C K N L S P S A K R K E S K S H K H P K					
430			440		
1390	1400	1410	1420	1430	1440
CTGTAATGGTTGAAAAATATGCGAGCATATGACAAGGGTAACAGAACACGCATATTGTTGG					
T V M V E N M R A Y D K G N R T R I L L					
450			460		

Fig. 4 Cont.

[図4]

```

1450      1460      1470      1480      1490      1500
|         |         |         |         |         |
GGTCGAGGCCTCCGAATTGTACAAACAATGTCAATGGTTCAGTCCATGTAAGGCCAAGT
G S R P P N C T N K C H G C S P C K A K
470                               480

1510      1520      1530      1540      1550      1560
|         |         |         |         |         |
TAGTTATTGTTTCATCGTATTATGCGCAGGAGTATTATCTCAGAGGTGGATATGCAGCT
L V I V H R I M P Q E Y Y P Q R W I C S
490                               500

1570      1580      1590      1600      1610      1620
|         |         |         |         |         |
GTCATGGCAAAATCTACCATCCATAATGAGATACATTGAAACTGTATGTGCTAGTGAATA
C H G K I Y H P -
510                               514

1630      1640      1650      1660      1670      1680
|         |         |         |         |         |
TTCTTGTGGTACAAATATTAGAACTGATATTGAAAAATAATCATCAATGTTTCTAAGGCAT

1690      1700      1710      1720
|         |         |         |
TTATAATAGATTATATTAATGGTTCAGCCTGGTGCAAAAAA

```

Fig. 4 Cont.

【图5】

10	20	30	40	50
MAMKLIAPMAFLAMQLIIMAAAEDQSAQIMLDSVVEKYLRNRSRLRKVEH				
60	70	80	90	100
SRHDAINIFNVEKYGAVGDGKHDCTEAFSTAWQAACKNPSAMLLVPGSKK				
110	120	130	140	150
FVVNNLFFNGPCQPHFTFKVDGIIAAYQNPASWKNNRIWLQFAKLTGFTL				
160	170	180	190	200
MGKGVIDGQGKQWWAGQCKWVNGREICNDRDRPTAIKFDFSTGLIIQGLK				
210	220	230	240	250
LMNSPEFHLVFGNCEGVKIIGISITAPRDSPTDGDIDIFASKNFHLQKNT				
260	270	280	290	300
IGTGDDCVAIGTGSSNIVIEDLICGPGHGIGISIGSLGRENSRAEVSYVHVN				
310	320	330	340	350
GAKFIDTQNGRLRIKTWQGGSGMASHIIYENVEMINSENPIILINQFYCTSA				
360	370	380	390	400
SACQNQRSQVQIQDVITYKNIRGTSATAAAIQLKCSDSMPCKDIKLSDISL				
410	420	430	440	450
KLTSGKIASCLNDNANGYFSGHVIPACKNLSPSAKRKESKSHKHPKTMV				
460	470	480	490	500
ENMRAYDKGNRTRILLGSRPPNCTNKCHGCSPCKAKLVIVHRIMPQEYYP				
510	514			
QRWICSCHGKIYHP				

Fig. 5

【図6】

	50	60	
Cry j II	R K V E H S R H D A I N I F N V E K Y G A		
ロング	R K V E H S R H D A I N I F N V E K Y G A		
ショート	S R H D A I N I F N V E K Y G A		
SAKAGUCHI	A I N I F N V E K Y		
	70	80	90
Cry j II	V G D G K H D C T E A F S T A W Q A A C K N P S		
ロング	V G D G K H D C T E A F S T A W ( Q ) K N P ( )		
ショート	V G D G K H D C T E A F S T A W ( Q ) K N P ( )		

(96)

特表平8-505284

Fig 6



【図 7】

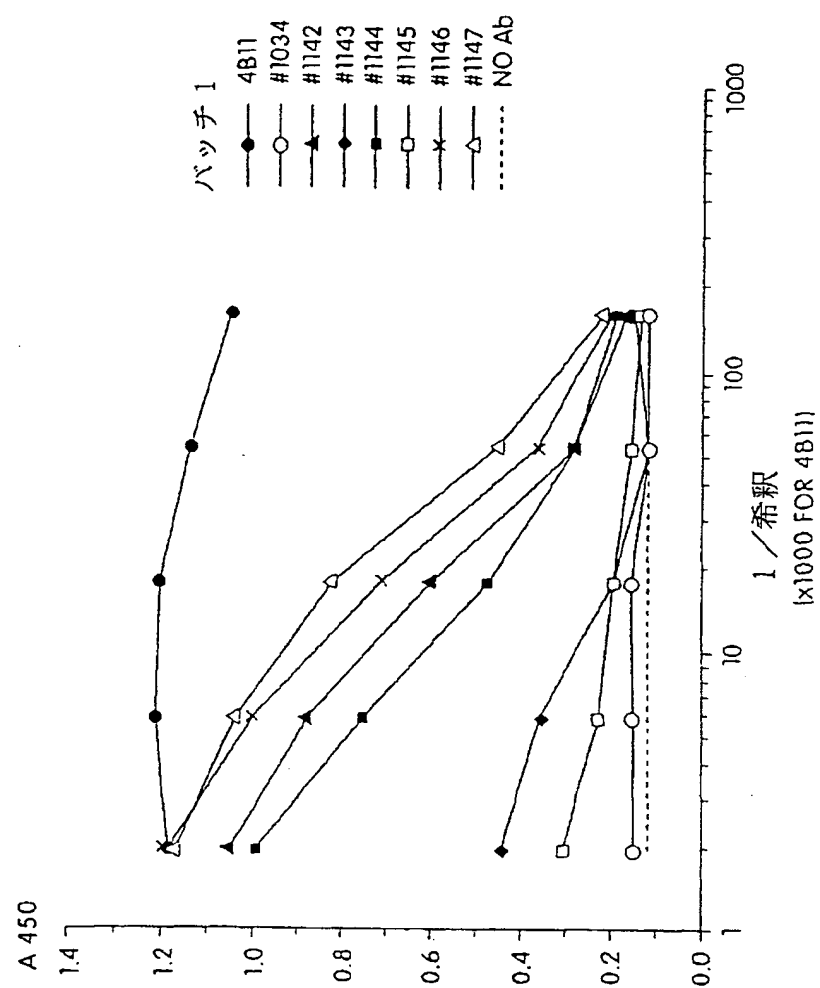


Fig. 7

【図8】

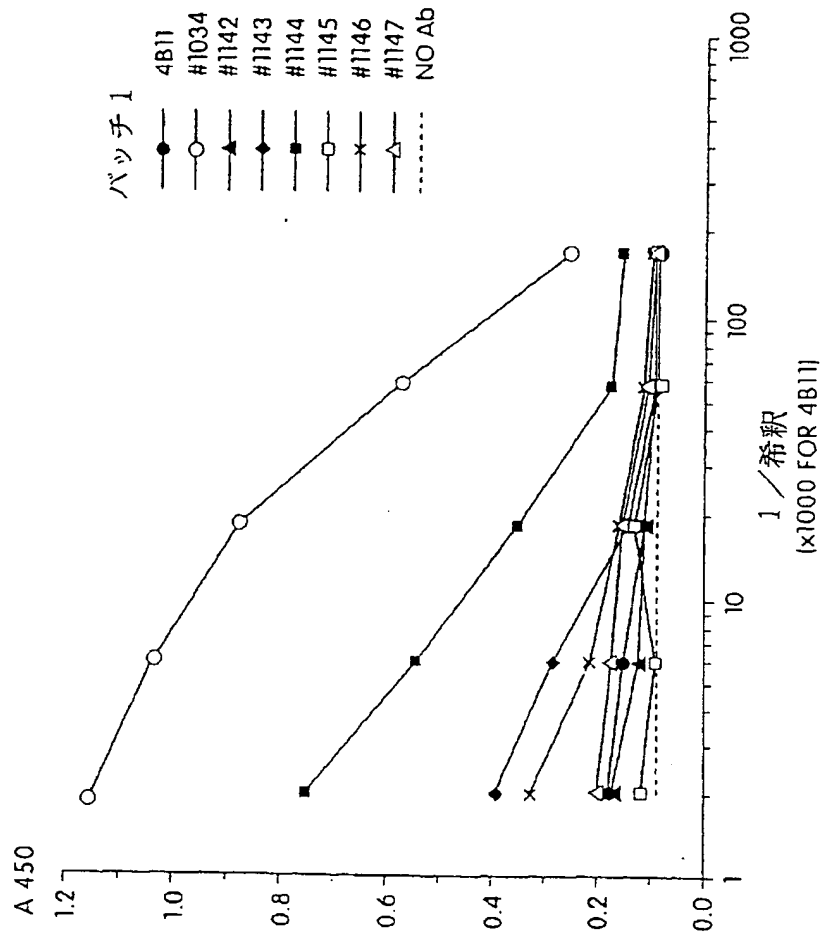


Fig. 8

【図9】

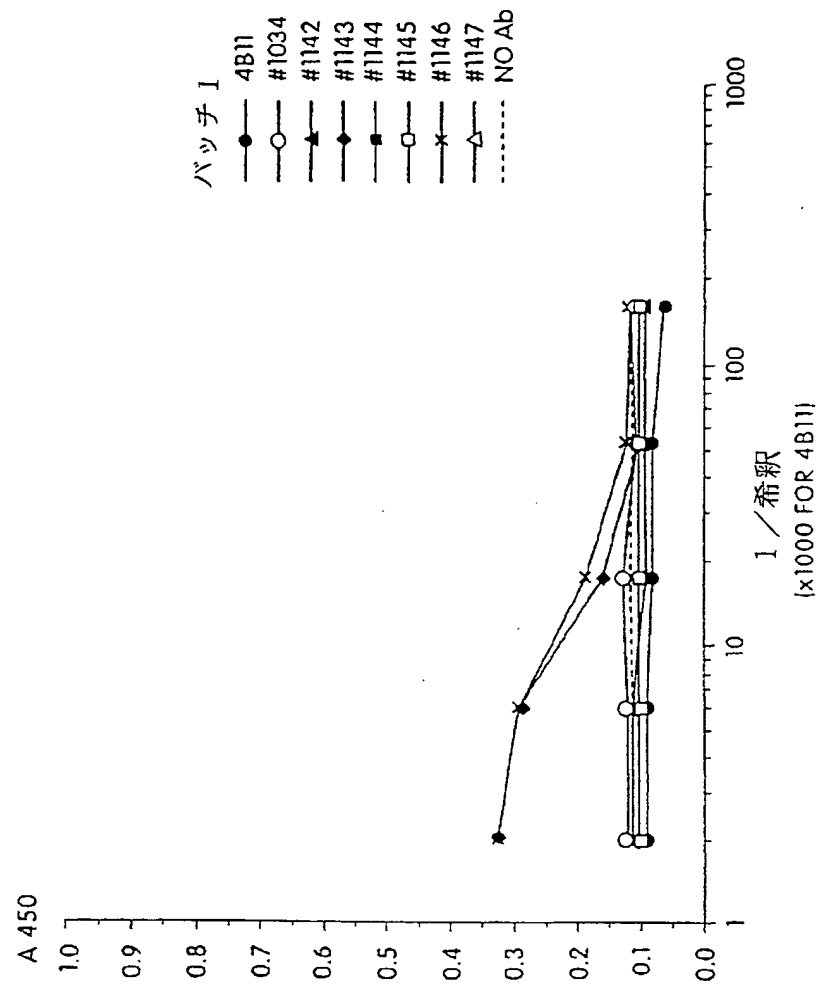


Fig. 9

【図10】

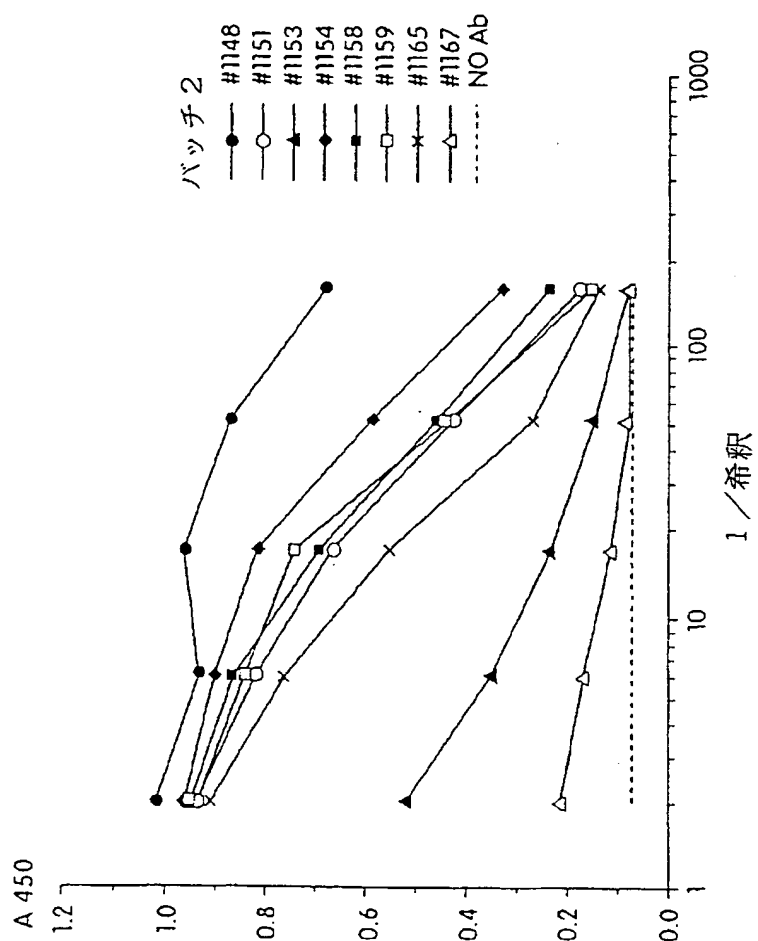


Fig. 10

【図11】

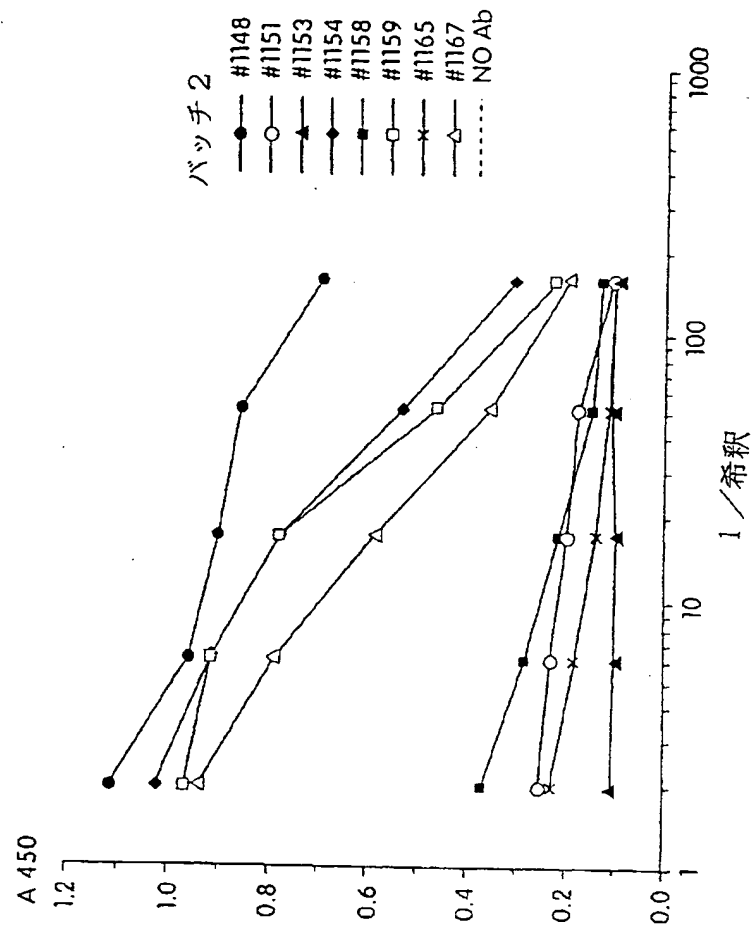


Fig. 11

【図 12】

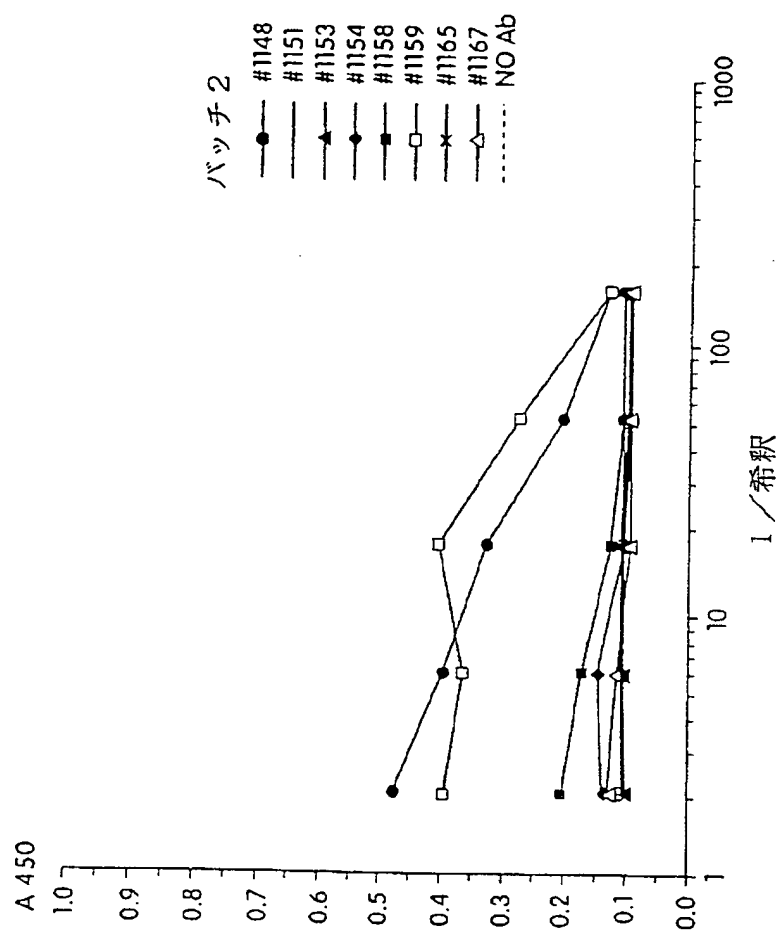


Fig. 12

【図13】

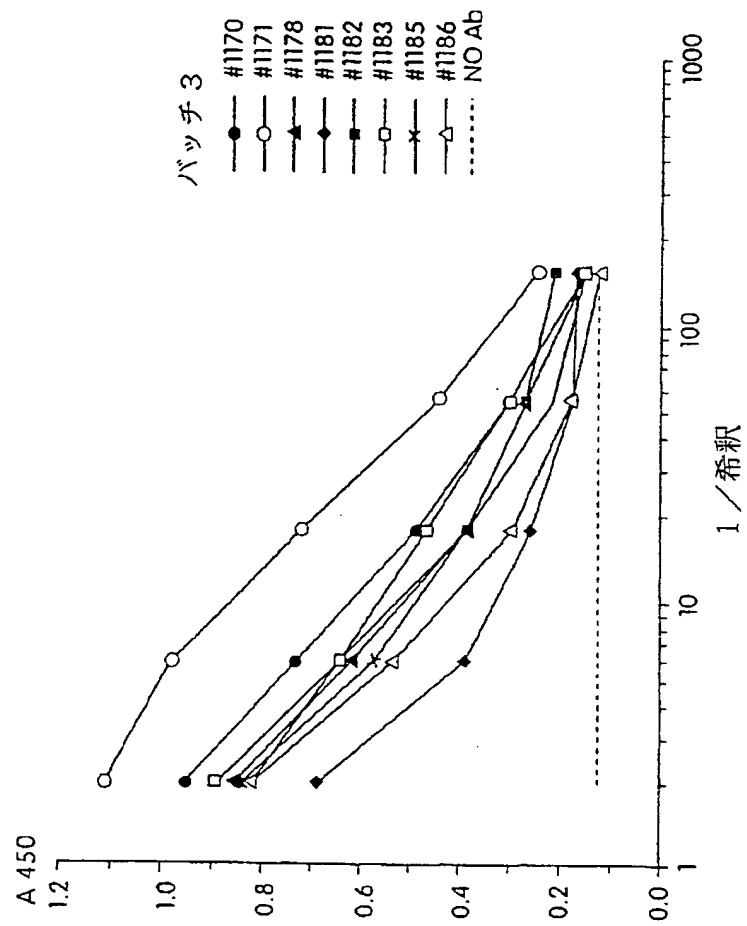


Fig. 13

【図14】

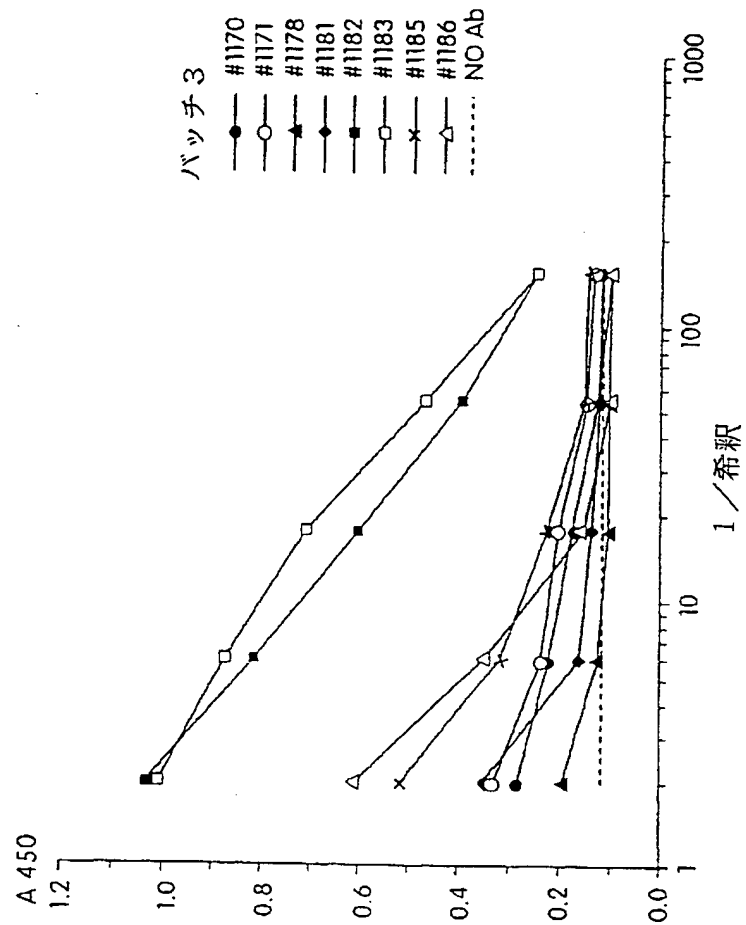


Fig. 14



【図15】

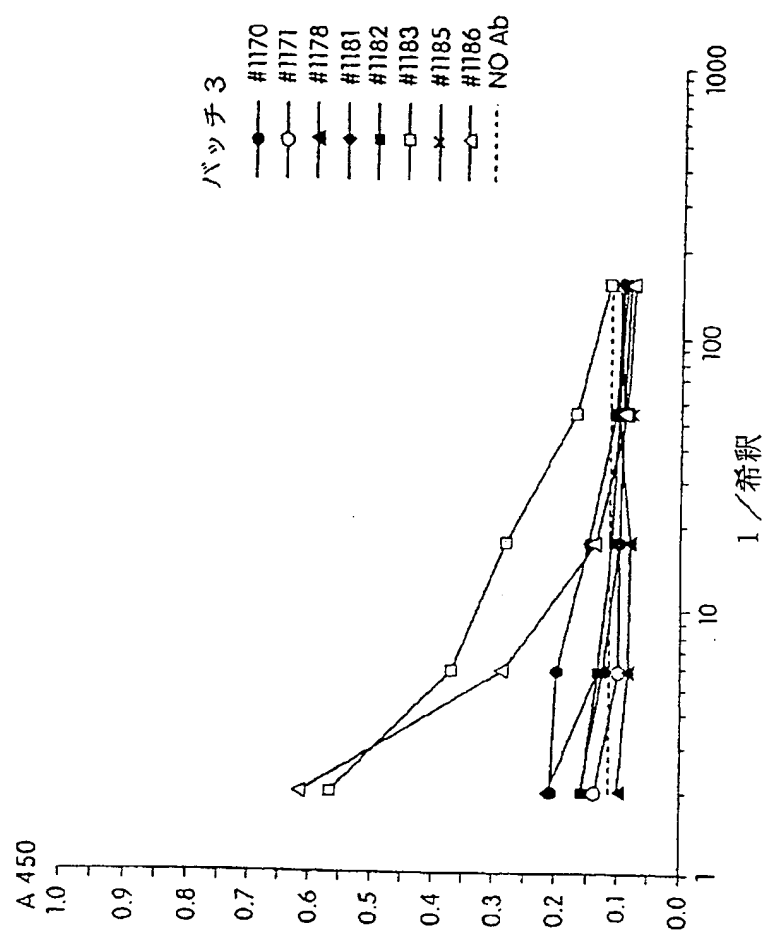


Fig. 15

【図 16】

患者番号 #	MAST	天然の 精製 Cry j I	天然の 精製 Cry j II	組換え Cry j II (rCry j II)
1034	2	-	+	-
1142	2	+	-	-
1143	0	+	+	+
1144	1	+	+	-
1145	0	-	-	+
1146	3	+	-	-
1147	3	+	-	-
1148	3	+	+	+
1151	3	+	+	-
1153	1	+	-	-
1154	3	+	+	-
1158	2	+	+	-
1159	2	+	+	+
1165	1	+	-	+
1167	1/0	-	+	-
1170	1/0	+	-	-
1171	2	+	-	-
1178	1	+	-	-
1181	1/0	+	-	-
1182	1	+	+	-
1183	1	+	+	+
1185	1/0	+	+	-
1186	1/0	+	+	+
陽性	21	20	13	5

Fig. 16

【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 5 C12N15/29 C07K13/00 C07K15/10 C12N1/21 C07K7/04		International Application No. PCT/US 93/11000
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 5 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ALLERGY vol. 45, 1990 pages 309 - 312 M. SAKAGUCHI ET AL.; 'Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen' cited in the application *whole document*	10, 13, 15-20, 24, 25
X	EP, A, 0 416 816 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARY SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) 13 March 1991 *page 3, line 55 - page 4, line 24; experiment I-3; example 5; claims* --- -/--	10, 11, 13, 15-25
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 March 1994		Date of mailing of the international search report 20. 05. 94
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 LV Rijswijk Tel. (-31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (-31-70) 340-3016		Authorized officer Yeats, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 93/11000

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>FEBS LETTERS vol. 239 , 1988 pages 329 - 332 M. TANIAI ET AL.; 'N-terminal amino acid sequence of a major allergen of Japanese cedar pollen' cited in the application *abstract*</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1
A	<p>WO,A,92 03551 (BIOMAY BIOTECHNIK PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELLSCHAFT MBH) 5 March 1992 *claims*</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Initial Application No

PCT/US 93/11000

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0416816	13-03-91	JP-A- 3093730	18-04-91
		US-A- 5073628	17-12-91
WO-A-9203551	05-03-92	AU-A- 8390191	17-03-92
		CA-A- 2067182	14-02-92
		EP-A- 0495064	22-07-92
		JP-T- 5502589	13-05-93

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	弁内整理番号	F I
C 0 7 H 21/04		B 8615-4C	
C 0 7 K 14/415		8318-4H	
C 1 2 N 1/21		8828-4B	
C 1 2 P 21/02		C 9282-4B	
21/08		9358-4B	
//(C 1 2 N 1/21			
C 1 2 R 1:19)			
(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:19)			
(72) 発明者	ブラウアー, アンドルー	ダブリュー,	
	アメリカ合衆国 01970	マサチューセッ	
	ツ, セイレム, ゲドニー	コート 21	
(72) 発明者	ボロック, ジョーン		
	アメリカ合衆国 02174	マサチューセッ	
	ツ, アーリントン, ニューカム	ストリー	
	ト 51		